



**PAULA CRISTINA
MONTEIRO DA
FONSECA VALE**

**POLIOMAVIRUS BK: COMPARAÇÃO ENTRE
CITOLOGIA E HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU***



**PAULA CRISTINA
MONTEIRO DA
FONSECA VALE**

**POLIOMAVIRUS BK: COMPARAÇÃO ENTRE
CITOLOGIA E HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Prof.^a Doutora Maria Begoña Criado, Professor Coordenador sem Agregação do Instituto Politécnico de Saúde do Norte e co-orientação da Prof.^a Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho ao meu marido pelo incansável apoio, principalmente nos momentos mais difíceis, e aos meus filhos, por terem sido compreensivos com as minhas ausências e terem suportado a minha indisponibilidade, nesta fase final.

o júri

presidente

Prof.^a Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Prof.^a Doutora Maria Begoña Criado Alonso
Professor coordenador sem agregação do Instituto Politécnico de Saúde do Norte

Prof. Doutor Carlos Alberto da Silva Lopes
Director de Serviço, do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António

Prof.^a Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
Professor auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Prof. Doutor Carlos Lopes, Director de Serviço, do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António, por me ter proporcionado acesso à informação e meios técnicos para a condução da minha tese.

À Dr.^a Adelaide Brito, Técnica Coordenadora do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António, por me ter permitido realizar o trabalho naquele laboratório, e por todo o apoio que me deu ao longo deste processo.

Ao meu colega e amigo Dr. Carlos Gouveia, por toda a dedicação e apoio que me deu na execução prática da técnica de Hibridização *In Situ*.

À minha grande amiga Sandra Relvas, por ter estado sempre presente, apoiando-me nos momentos mais difíceis, demonstrando todo o seu grande espírito de inter-ajuda e amizade.

Ao meu marido, por ter estado sempre ao meu lado, apoiando-me incondicionalmente e encorajando-me a continuar, principalmente nos momentos mais difíceis.

À minha filha Sandra, pela sua alegria de viver e boa disposição, que me fez esquecer, embora que momentaneamente, os momentos difíceis por que passei nesta fase final. Desculpa-me, se nem sempre tive tempo para ti!

Ao meu filho Daniel, com um grande pedido de desculpas, pela intolerância e falta de disponibilidade que demonstrei nestes últimos meses.

Aos meus pais, por terem estado presentes sempre que precisei.

Ao meu amigo Prof. Doutor Fernando Ferreira, por me ter incentivado a fazer o mestrado e ter demonstrado a sua preocupação constante em me ajudar.

Aos meus amigos mais chegados, por estarem sempre presentes e disponíveis para ajudar.

Aos meus alunos, pela compreensão e solidariedade demonstradas ao longo deste semestre.

palavras-chave

Poliomavirus, Nefropatia, Transplante renal, BKV, Rim, Hibridização *In Situ*, Células Decoy, Diagnóstico, Citologia urinária, Padrões histológicos

resumo

Em situações de diminuição da imunidade, como é o caso dos doentes transplantados renais, estima-se que 10 a 60% dos pacientes apresentam reactivação das infecções latentes por BKV. Aproximadamente 6% dos doentes transplantados renais apresentam nefropatia por Poliomavírus BK (NBKV), levando à perda de aproximadamente 45 a 50% dos enxertos. A citologia urinária, com contagem de células *decoy*, é o método mais utilizado para o diagnóstico de BKV nos casos dos doentes transplantados renais.

O presente trabalho teve como objectivo investigar a incidência do Poliomavírus (PV) na citologia urinária em relação às variáveis clínico-patológicas como sexo, idade e período pós-transplante. Tendo em consideração as limitações da citologia urinária foi também objectivo deste trabalho investigar se o método de hibridização *in situ* com cromogénio (CISH), poderá ser uma ferramenta útil no diagnóstico do BKV.

Foram usadas 66 amostras de urina, de pacientes transplantados, processadas para diagnóstico citológico pelo método de *ThinPrep*® 2000 e classificadas como negativa, positiva ou sugestiva para PV.

Das 66 amostras analisadas (77,3% de homens e 22,7% de mulheres) 16 (24,2%) apresentaram células *decoy* e 5 (7,6%) casos foram sugestivos de infecção por PV. Quando analisadas as variáveis clínico-patológicas observa-se que a incidência de PV na urina se associa significativamente ($p < 0,05$) com o sexo masculino, no período pós-transplante > 6 meses e no grupo etário 51-60 anos. Em relação ao CISH, verificou-se uma alta correlação entre os resultados obtidos por esta metodologia e os obtidos na citologia urinária, sendo possível mediante CISH discriminar entre infecção por BKV e JCV.

Dos resultados obtidos conclui-se que a identificação das células *decoy* pode ajudar no diagnóstico da replicação viral ou infecção activa por PV tendo, a citologia urinária, um papel importante como método de *screening*. No entanto, a citologia pode conduzir a resultados falso positivos e não permite o diagnóstico diferencial entre o BKV e o JCV. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a técnica de CISH pode ser uma ferramenta importante, no diagnóstico diferencial entre os dois tipos de PV.

keywords

Polyomavirus, Nephropathy, Renal transplant, BKV, Kidney, *In Situ* Hybridization, Decoy cell, Diagnosis, Urine cytology, Histological pattern

abstract

In situations of decreased immunity, as is the case of renal transplant patients, it is estimated that 10 to 60% of patients have reactivation of latent infection by BKV. Approximately 6% of renal transplant patients have Polyomavirus BK nephropathy (NBKV), leading to loss of about 45 to 50% of the grafts. Urinary cytology, with count of decoy cells, is the most widely used method for diagnosis of BKV in cases of renal transplant patients.

This study aimed to investigate the incidence of the Polyomavirus (PV) in urinary cytology in relation to clinical pathological parameters such as sex, age and post-transplant period. Given the limitations of urinary cytology was also an objective of this study to investigate whether the method of in situ hybridization with chromogenic (CISH), may be a useful tool in the diagnosis of BKV.

We used 66 urine samples of transplant patients, processed for cytological diagnosis by the method of Thin Prep® 2000 and classified as negative, positive or suggestive for PV.

Of the 66 samples analyzed (77.3% men and 22.7% women) 16 (24.2%) had Decoy cells and 5 (7.6%) cases were suggestive of infection with PV. When analyzing the clinical pathological parameters was observed that the incidence of PV in the urine is associated with significantly ($p < 0.05$) with the male in the post-transplant period >6 months and in the age group 51-60 years. For the CISH, there was a high correlation between the results obtained by this methodology and urinary cytology, it is possible by CISH discriminate between infection with BKV and JCV.

From the results it is concluded that the identification of decoy cells may help in diagnosing viral replication or active infection by PV and the urine cytology, an important role as a screening method. However, cytology may lead to false positive and does not allow the differential diagnosis between BKV and JCV. The results of this study indicate that the technique of CISH may be an important tool in the differential diagnosis between the two types of PV.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1 – Virião do BKV.....	25
Figura 2 – Ciclo de replicação do Poliomavírus.....	26
Figura3 – Organização genômica do BKV.....	26
Figura 4 – Representação esquemática do rim.....	29
Figura 5 – Nefropatia por BKV.....	35
Figura 6 – Tipos de inclusões virais.....	36
Figura 7 – Nefropatia por BKV estadio A.....	37
Figura 8 – Nefropatia por BKV estadio B.....	38
Figura 9 – Nefropatia por BKV estadio C.....	38
Figura 10 – Células <i>decoy</i> em citologia urinária.....	39
Figura 11 – Células <i>decoy</i> em urina processada por HIS.....	43
Figura 12 – Citologia urinária positiva para PV.....	53
Figura 13 – Distribuição do diagnóstico citológico por sexo.....	53
Figura 14 – Distribuição do diagnóstico citológico por grupos etários.....	54
Figura 15 – Distribuição do diagnóstico citológico por período pós-transplante.....	55
Figura 16 – Citologia urinária positiva para PV	55
Figura 17 – Correlação entre o número de células infectadas e o diagnóstico de positivo ou sugestivo para PV.....	56
Figura 18 – Correlação entre o diagnóstico citológico e o diagnóstico do CISH para o BKV.....	57
Figura 19 – Correlação entre o número de células <i>decoy</i> na citologia urinária e o diagnóstico do CISH para o BKV.....	58
Figura 20 – CISH positiva para BKV	57
Figura 21 – CISH positiva para BKV.....	59
Figura 22 - Esquema para orientação clínica e adequada avaliação do risco de desenvolver NBKV, em pacientes transplantados renais.....	62

INDÍCE DE TABELAS

Tabela 1 – Factores de risco de infecção por BKV.....	30
Tabela 2 – Correlação entre o diagnóstico citológico, o CISH e PCR para o BKV e o JCV no sangue e na urina.....	60

INDÍCE DE ANEXOS

Anexo A – Tabela dos resultados globais obtidos neste estudo.....	77
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BKV – BK Vírus

CHP-HSA – Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António

CISH – Hibridização *In Situ* com cromogéneo

HE – Hematoxilina - Eosina

HIS – Hibridização *In Situ*

IHQ - Imunohistoquímica

JCV – JC Vírus

NBKV – Nefropatia por BK Vírus

ORI – Origem da replicação

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PV – Poliomavírus

QPCR – *Quantitative - Polymerase Chain Reaction*

RT-PCR – *Reverse transcription - Polymerase Chain Reaction*

RRNC – Região regulatória não codificante

SV 40 – *Simian Vírus 40*

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. O Poliomavírus.....	23
1.2. O Poliomavírus BK.....	25
1.3. Infecção por Poliomavírus BK em transplante renal.....	29
1.3.1. Nefropatia por Poliomavírus BK.....	31
1.4. Diagnóstico do Poliomavírus BK.....	33
1.4.1. Histologia.....	34
1.4.2. Citologia.....	39
1.4.3. Polymerase Chain Reaction.....	41
1.4.4. Imunohistoquímica.....	42
1.4.5. Hibridização <i>In Situ</i>	43
1.4.6. Microscopia Electrónica.....	44
2. OBJECTIVO.....	45
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1. Processamento da citologia urinária para pesquisa de células <i>decoy</i>	47
3.2. Preparação das amostras para hibridização <i>in situ</i> com cromogéneo.....	48
3.3. Hibridização <i>in situ</i> com cromogéneo.....	49
3.4. Análise estatística.....	51
4. RESULTADOS.....	53
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	69
BIBLIOGRAFIA.....	71
ANEXOS	
Anexo A - Tabela dos resultados globais obtidos neste estudo.....	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. O POLIOMAVIRUS

O Poliomavirus (PV) é o único género de vírus da família *Poliomaviridae* e afecta uma ampla variedade de vertebrados [1,2]. O primeiro vírus deste género foi descoberto em 1953 por Ludwing Gross, quando estudava as leucemias em murinos e foi denominado de *Poliomavirus Murino* porque causava tumores sólidos em múltiplos locais [1,2]. O segundo membro desta família, o *Simian Vírus 40* (SV 40), foi isolado por Sweet and Hilleman em 1960 em culturas celulares de rim de macaco verde africano e era muito semelhante ao *Poliomavírus Murino*. O SV40 contaminou algumas vacinas contra o poliovírus e o adenovírus preparadas a partir de culturas de células de rim de macaco verde africano, o que levou a que muitos milhares de pessoas, principalmente nos EUA e na União Soviética, fossem inoculados com SV40 activo [1]. Devido à capacidade de transformação maligna que este vírus possuía, este facto causou grande preocupação, no entanto, estudos posteriores mostraram que a população que tinha sido inoculada com o SV40, mostrava anticorpos contra o vírus, mas não havia nenhuma indicação de maior incidência de quaisquer tumores malignos ou outras situações patológicas, em relação à população que não tinha sido contaminada com o vírus [1,2].

Em 1971 foram descobertos os dois primeiros PV com potencial patogénico para humanos, o JC Vírus (JCV) e o BK vírus (BKV). O primeiro foi isolado num caso de leucoencefalopatia multifocal progressiva e o segundo num paciente imunossuprimido por transplante renal. Os nomes destes vírus derivam das iniciais dos nomes dos doentes onde foram encontrados pela primeira vez [1,2,3,4,5,6]. As infecções por estes vírus são estritamente humanas, ocorrem em geral na infância e permanecem por toda a vida, aparentemente no estado lactente, no rim. [1,3,7,8,9,10]. A reactivação das infecções lactentes dá-se no tracto urinário, com eliminação assintomática do vírus pela urina e está especialmente associada a situações de diminuição da imunidade celular, sendo

a replicação viral intensa e o sistema imune incapaz de a conter [1,8,9]. Dependendo do grau de reactividade, ou seja, da intensidade da replicação viral, o vírus pode ser eliminado na urina sem entrar na corrente sanguínea, persistir na urina ou progredir para viremia e estabelecer doença [8].

As infecções activas por BKV estão associadas a uma variedade de patologias renais e do tracto urinário, sendo as mais importantes a nefrite tubular que pode levar a uma perda do transplante renal e a cistite hemorrágica nos pacientes com transplante de medula óssea, enquanto o JCV, pouco frequente, está altamente associado ao desenvolvimento de leucoencefalopatia multifocal progressiva, uma manifestação rara de infecção cerebral por PV, que costuma progredir de uma forma rápida e fatal [8,4,11,12,13]. Esta doença causada pelo JCV afecta o cérebro e a espinhal medula e tornou-se muito frequente em indivíduos com deficiência na função imunológica, como é o caso das doenças linfoproliferativas, SIDA, terapias imunossupressoras pós-transplante, quimioterapia e doenças auto-imunes como a esclerose múltipla e doença de Crohn [14].

Mais recentemente foram descritos outros PV, o KIPyV e o WU Vírus, descobertos em 2007 em secreções respiratórias [11,15]. O KIPyV foi o terceiro PV a ser descrito em amostras clínicas humanas, na sequência de uma pesquisa sistemática, de vírus desconhecidos, em amostras clínicas do tracto respiratório. Este vírus possui ácido nucleico com organização genómica característica dos PV e uma grande região da sequência de aminoácidos homóloga [15]. O KIPyV está filogeneticamente relacionado com os poliomavírus conhecidos no que diz respeito à região precoce, mas apresenta uma homologia muito pequena (identificados menos de 30 aminoácidos) com a região tardia desses mesmos PV [15]. Alguns estudos feitos com o objectivo de identificar os possíveis locais de replicação e a prevalência do KIPyV mostraram a sua presença nos aspirados nasofaríngeos e fezes, enquanto na urina, leucócitos e soro os resultados foram negativos. Em relação à faixa etária, na nasofaringe variou entre 1 mês e 26 anos (média de 2 anos), enquanto nas fezes as amostras positivas pertenciam a crianças com 3 meses de idade [15]. A descoberta do KIPyV em amostras humanas confirmam-no como patógeno humano e, a sua parcial relação com o

JCV e o BKV assim como a prevalência em crianças indicam que os humanos são provavelmente o hospedeiro natural. No entanto, são necessários mais estudos, em particular estudos serológicos, para confirmar este facto [15].

O vírus WU (WUV) foi isolado em aspirados nasofaríngeos de crianças com 3 anos de idade, internadas com pneumonia, diferindo significativamente do BKV e do JCV na sequência genómica e no seu relativo tropismo tecidual, o que sugere propriedades biológicas únicas [11]. Os estudos efectuados mostraram haver uma elevada divergência na sequência das proteínas da cápside, VP1 e VP2, do WUV, o que pode reflectir um comportamento diferente quando comparado com os outros PV conhecidos. Por outro lado, a presença do WUV nas secreções respiratórias e ausência nas amostras de urina, sugerem que o modo de transmissão ou os locais de reactivação podem ser distintos dos outros PV [11]. De acordo com os investigadores muitas perguntas estão ainda por responder, tais como, é o WUV um patógeno humano? A infecção por WUV pode predispor ou facilitar infecções secundárias por outros vírus respiratórios? Pode o WUV ser parte de uma flora viral endógena que é reactivada por uma inflamação ou qualquer outro aspecto de infecção viral? Em que parte do corpo reside? Em que idade é que a infecção ocorre? [11].

1.2. O POLIOMAVÍRUS BK

Dos quatro poliomavírus humanos descritos, dedicar-nos-emos em particular ao BKV, que é um vírus constituído por *DNA* circular de cadeia dupla, super-helicoidal, com aproximadamente 5.000 pares de bases. Apresenta 45 nm de diâmetro e uma cápside de simetria icosaédrica, com 72 capsómeros. A cápside é constituída por três proteínas, VP1, VP2 e VP3, representando a VP1 75% do total das proteínas virais (Figura 1) [1,2,4,6,10, 12,16,17,18].

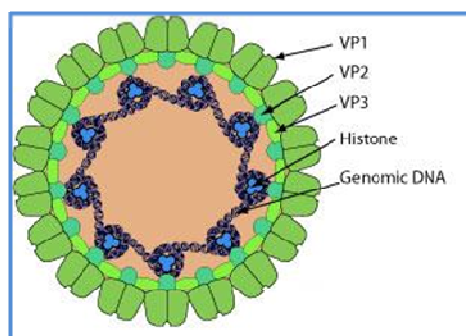


Fig. 1 - Viriã do BKV. (Adaptado de: http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/58.html. 2009)

Cerca de 12% do viri3o 3 3 constitu3ido pela cadeia do DNA ao qual est3o associadas quatro histonas nucleossomais celulares, H2A, H2B, H3 e H4, formando um complexo denominado de minicromossoma viral. [1,8,16,17,18].

A adsor33o do v3rus depende da presen3a de receptores celulares que reconhecem a prote3na VP1, sendo a entrada dos viri3es feita por endocitose. Uma vez no citosol, os v3rus s3o transportados para o n3cleo das c3lulas, pela intera33o dos vacuolos endoc3ticos com o citoesqueleto, onde se vai dar todo o processo de replica33o e produ33o de viri3es (Figura 2) [1,16,19,20].

O genoma do BKV 3 constitu3ido por uma regi3o codificante geneticamente conservada, dividida em regi3o precoce e regi3o tardia e uma regi3o regulat3ria n3o codificante (RRNC) muito vari3vel (Figura 3) [4,8, 10,16,18].

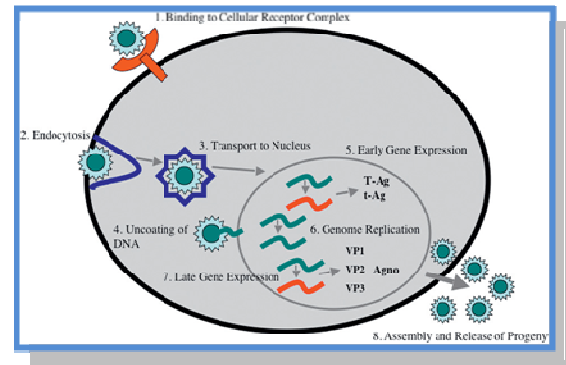


Fig. 2 – Ciclo de replica33o do Poliomav3rus. O ciclo de vida inicia-se com a liga33o do v3rus aos receptores celulares; depois da intera33o inicial o v3rus 3 internalizado por endocitose, sendo ent3o transportado para o n3cleo onde o genoma viral 3 exposto para dar in3cio 3 express3o dos genes precoces. Em seguida d3-se a replica33o do genoma viral, que precede a produ33o dos genes tardios. Os novos viri3es s3o ent3o enviados para o exterior [16].

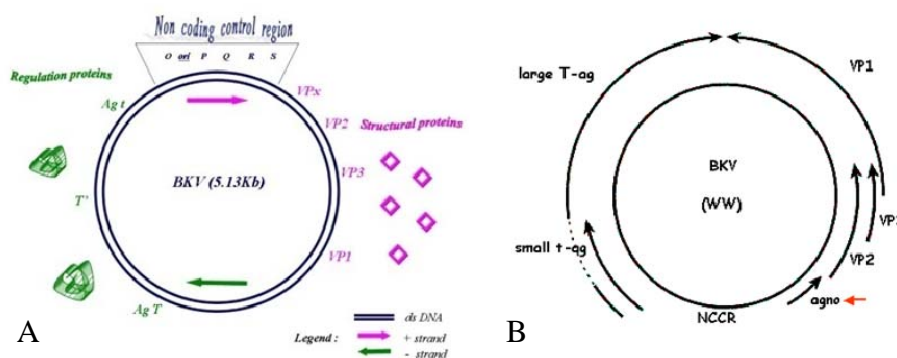


Fig. 3 – A) Representa33o esquem3tica da organiza33o gen3mica do BKV. O genoma est3 dividido em tr3s regi3es: a regi3o precoce que codifica as prote3nas reguladoras (AgT, Agt e T'); a regi3o tardia que especifica as prote3nas estruturais e as agnoprote3nas (VP1, VP2, VP3 VPx) e a regi3o regulat3ria n3o codificante que cont3m a origem da replica33o (ORI). [7]. B) Representa33o esquem3tica do genoma do BKV. (Adaptado de: <http://www.sigtrans.org/research/BKV-agnoprotein>. 2009)

O ciclo produtivo tem lugar em duas fases, separadas pela replicação do *DNA* viral [16]. A região precoce é a primeira parte do genoma a ser transcrita e traduzida. Os seus genes codificam os primeiros *mRNAs*, pela *RNA* polimerase II da célula hospedeira, dando origem a duas proteínas não estruturais, TAg e tAg, transcritas antes da replicação do *DNA* e expressas logo a seguir à infecção das células hospedeiras [1,4,16]. Estas proteínas são produzidas por *splicing* alternativo de um pré-*mRNA* comum e podem ser distinguidas pelo seu tamanho [4,16]. A denominação destas proteínas tem origem no facto de terem sido inicialmente detectadas através de reacções serológicas (antigénios) e estarem envolvidas no processo de transformação (T) [1,4,16]. Os TAg são factores de activação essenciais para a replicação do *DNA* viral e regulam a transcrição e replicação do genoma viral [1,4,16]. Através da sua múltipla actividade enzimática e capacidade de se ligar ao *DNA* e a uma série de proteínas celulares, o TAg controla a produção do *mRNA* precoce, a iniciação da replicação viral e a activação da transcrição dos genes tardios [8,16]. A ligação do TAg à forma hipofosforilada da proteína do retinoblastoma (pRb), permite a libertação prematura do factor de transcrição E2F, induzindo as células hospedeiras a entrarem na fase S do ciclo celular, controlando desta forma a progressão do ciclo celular e a apoptose das células infectadas [16]. Uma vez estabelecido o ambiente adequado, o TAg recruta o complexo *DNA* polimerase, da célula hospedeira para a origem da replicação viral (ORI), de forma a dar início à síntese bidireccional do *DNA* viral. A activação dos promotores virais tardios, pelo TAg e factores de transcrição celular associados, leva à expressão dos genes virais tardios [16]. O papel do tAg no ciclo de vida do PV não está ainda completamente definido, verificando-se produto de replicação viral na ausência completa da proteína. Acredita-se ter um papel auxiliar na actividade do TAg e transformação celular [16].

Depois do início da replicação, os genes da região tardia sintetizam as proteínas estruturais da cápside, VP1, VP2 e VP3 [8]. Estas três proteínas derivam de um pré-*mRNA* comum por *splicing* alternativo [16]. Localizam-se no compartimento intranuclear, sendo a VP1 a maior proteína da cápside. Ela medeia a conexão viral aos receptores nas células susceptíveis e contém

epitopos de neutralização, de inibição da hemaglutinação e possui ainda determinantes imunológicos próprios e outros compartilhados com as células hospedeiras. A VP2 e VP3 são as proteínas mais pequenas da cápside e têm apenas função estrutural [8]. É ainda sintetizada uma agnoproteína, que difere de todas as outras proteínas sintetizadas pela região precoce e tardia, por se localizar primariamente no citoplasma e na região perinuclear das células infectadas [8]. A distribuição intracelular desta proteína sugere que ela participe na montagem da cápside viral, na lise e na libertação celular do vírus replicado [8,16,21].

A região regulatória não codificante, está localizada entre as regiões codificantes precoce e tardia e contém a origem da replicação do *DNA* (ORI), a TATA box, locais de ligação ao TAg, locais de ligação aos factores da transcrição celular e, promotores e potenciadores bidireccionais para a transcrição dos genes precoces e tardios. A região potenciadora do BKV consiste em três repetições de 68-pb, sujeitas a deleções, duplicações e rearranjos nas diferentes variantes de BKV, codificando inúmeros factores reguladores envolvidos na transcrição e na replicação viral [8,16].

A expressão e subsequente localização nuclear das proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3, levam à montagem da cápside do virião, constituída por 360 moléculas da proteína principal VP1, cuja organização em 72 pentâmeros dá origem à forma icosaédrica. As proteínas menores, VP2 e VP3, permanecem no centro de cada pentâmero [14]. O *DNA* é compactado com as histonas H2A, H2B, H3 e H4, criando uma estrutura minicromossomal praticamente indistinguível da cromatina do hospedeiro [16].

Continua por determinar se a via de libertação dos novos viriões é a lise celular ou o transporte vesicular [16].

1.3. INFECÇÃO POR POLIOMAVÍRUS BK EM TRANSPLANTE RENAL

A infecção pelo BKV é estritamente humana e é adquirida na maior parte das vezes na infância, como infecção primária do pulmão [1,4,6,7,12,21,22,23,24]. Os sintomas da infecção pulmonar incluem febre e achados inespecíficos do tracto respiratório alto [21]. A disseminação sanguínea da infecção primária transporta o BKV para o rim (Figura 4) e urotélio, onde o vírus entra em latência [1,4,6,7,12,21,22,23,24,25]. O BKV pode infectar também os leucócitos, as amígdalas e o cérebro [21]. Nesta fase de latência, o *DNA* viral comporta-se muito provavelmente como episomal, sendo a expressão dos genes precoces muito baixa e a dos genes tardios reprimida por factores celulares [21].

Cerca de 5 a 20% dos indivíduos imunocompetentes apresentam reactivação com replicação do vírus na urina, em baixa quantidade [12,22,23], e na população humana, entre os 40 e os 50 anos de idade, mais de 80% dos indivíduos possuem anticorpos contra o BKV. No entanto, este vírus não é, patogénico ou naturalmente oncogénico [1,2,6,12,21,23,26], pelo que a reactivação das infecções latentes, com replicação elevada e eliminação pela urina das células infectadas com o vírus, observa-se em indivíduos com diminuição da imunidade celular, após transplante de órgãos, infecção por HIV e doenças hematológicas. Pacientes com menor grau de imunossupressão, tais como mulheres grávidas, diabéticos e idosos, podem também apresentar um risco aumentado de replicação virica e eliminação na urina [1,12,21,22,23,24,26,27].

Assim, o BKV assume particular importância em pacientes submetidos a transplante renal, uma vez que a sua reactivação é causa de disfunções renais graves do enxerto [3].

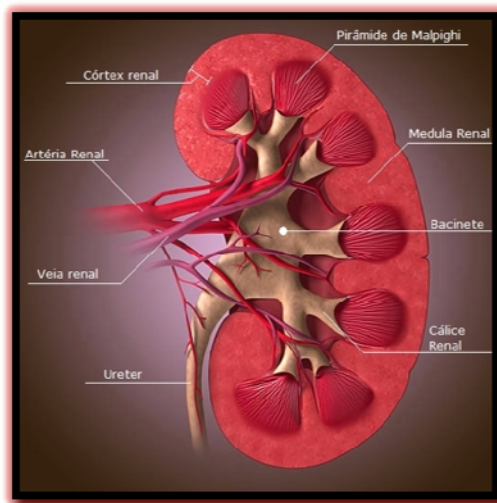


Fig. 4 – Representação esquemática do rim. (Adaptado de: <http://profs.ccems.pt/Palma/Ciencias/6%C2%BAano/Sistema%20Excretor/Sistema%20Urin%C3%A1rio/JCloze/JCloze.htm>. 2009)

Os factores de risco de infecção por BKV em pacientes transplantados podem estar relacionados com o dador, o receptor, o transplante ou o vírus (tabela 1), havendo estudos que mostram uma taxa elevada de infecção em receptores que receberam um enxerto de um dador seropositivo para o BKV [28,29,30].

Tabela 1 – Factores de risco de infecção por BKV em pacientes transplantados [2,5,28,29,31]

	Factores de risco
Dador	Tipo de dador: morto ou vivo; presença de BKV activo ou infecção por citomegalovírus; dador seropositivo; ausência de HLA-C7.
Receptor	Idade avançada; sexo masculino; raça caucasiana; diabetes mellitus; infecção por citomegalovírus; lesão prévia dos túbulos renais; receptor seronegativo; ausência de HLA-C7.
Transplante	Aquisição de lesão; tempo de isquemia fria; atraso na função do enxerto; imunossupressão com tacrolimus, micofenolato mofetil ou sirolimus; tratamento de rejeições agudas com agentes redutores de linfócitos ou esteroides; drogas tóxicas; aumento do número de HLA <i>mismatches</i> .
Vírus	Variantes na VP1; alterações da sequência na região regulatória não codificante.

Estima-se que 10 a 60% dos pacientes imunossuprimidos por transplante renal tenham reactivação de BKV, sendo actualmente reconhecida a sua forte associação a disfunções renais graves e a perda do rim transplantado [27,3,7,22,32,33]. A replicação pode ocorrer nas células uroteliais ou nas células epiteliais tubulares, sendo que a sua identificação na citologia urinária pode não ser significativa de envolvimento renal [22].

Uma vez reactivado, dá-se a propagação de uma infecção ascendente via “*cell-to-cell*”, cuja sequência é, ductos colectores medulares, túbulos corticais proximais e distais e cápsula de Bowman’s, e que sem o controlo imunológico adequado leva a uma infecção lítica progressiva [34,35]. Isto resulta em células tubulares com núcleo aumentado contendo inclusões virais perinucleares. A lise

das células infectadas leva à disseminação do vírus para o lúmen tubular, urina, interstício e células adjacentes. Subsequentemente, a necrose das células tubulares conduz à ruptura da membrana basal e à destruição da parede dos capilares tubulares que resulta na propagação vascular do vírus [4,20,34,35].

Os achados clínicos da reactivação do BKV no rim e bexiga incluem, hematúria assintomática, cistite hemorrágica e não hemorrágica, estenose ureteral e disfunção do rim transplantado com nefropatia por Poliomavírus BK (NBKV) [21,28,36].

1.3.1. NEFROPATIA POR POLIOMAVÍRUS BK

A NBKV afectando o transplante renal foi descrita pela primeira vez, por Mackenzie, como um caso isolado em 1978. Nos anos 80 os casos de NBKV foram muito raros, tendo havido uma mudança drástica em meados dos anos 90 [8,18,28,46]. Acredita-se que a incidência crescente de NBKV, nesta década, se encontre associada ao uso de fármacos imunossupressores fortes, tais como o tacrolimus, o micofenolato mofetil e o sirolimus [2,3,4,5,6,8,10,12,13,22,26,28,30,31,36,37]. O tacrolimus é um inibidor potente da calcineurina, utilizado como profilaxia e tratamento de episódios de rejeição aguda grave e tem sido associado ao desenvolvimento de NBKV [8]. Actualmente, a NBKV é de longe a infecção mais importante envolvendo o rim transplantado, sendo a causa de perda prematura do enxerto renal [2,30,37,38,39,40,41].

De acordo com a bibliografia, cerca de 6% dos transplantados renais apresentam nefrite intersticial, levando à perda de aproximadamente 45 a 50% dos enxertos por fibrose e atrofia tubular [3,6,7,10,13,22,41,42,43,44,]. A maioria dos episódios de nefrite intersticial por BKV ocorre, nos primeiros três meses após o transplante [6,8,36,45], e os restantes até um ano após o transplante [6].

Na reactivação da infecção, a virúria intermitente precede normalmente a virúria persistente, que por sua vez precede a viremia. Este princípio orienta a relativa utilidade dos testes de rastreio no reconhecimento da NBKV [21,34].

As manifestações clínicas da NBKV variam entre um estado de viremia e nefrite até uma disfunção renal clínica [2], apresentando, de um modo geral, pouca sintomatologia, associada a uma elevação da creatinina sérica. O diagnóstico é confirmado pelo exame histológico, não só para demonstrar as alterações sugestivas da infecção por BK, mas também para excluir possíveis condições coexistentes como é o caso da rejeição aguda, toxicidade dos calcineurínicos ou recidiva da doença renal [6,22,46]. A presença na urina de células com inclusões virais, denominadas de células *decoy*, são sinal de replicação do BKV no tracto urinário, mas não são indicador específico de NBKV [46].

Os doentes, após o transplante, devem ser inseridos num programa intenso de monitorização da viremia e viruria por BKV, para evitar a ocorrência da nefrite [2,32]. Está recomendado, que em doentes transplantados renais, seja feito o rastreio da reactivação do BKV, a cada três meses, durante os primeiros dois anos após o transplante, quando é notada uma disfunção do enxerto e quando é realizada biopsia. Após este período, deverá ser anual até ao quinto ano [4,33,34].

O rastreio deve ser feito através da pesquisa de células *decoy* na citologia urinária. Um rastreio positivo deve ser confirmado no período de quatro semanas, com um método quantitativo, para detecção do *DNA* ou *RNA* no plasma ou na urina. Os doentes que mantenham níveis virais elevados por mais de três semanas devem ser submetidos a biopsia e intervenção, e continuar a ser monitorizados até o nível viral descer abaixo do valor limiar e preferencialmente a níveis indetectáveis [4,33,34,].

O tratamento da NBKV consiste na redução da terapia imunossupressiva, administração de antivirais e imunoglobulinas [2,5,27,30,33,34,36,41], podendo levar à resolução de aproximadamente 95% das viremias, sem aumento de rejeição aguda, disfunção renal ou perda do rim transplantado [32], desde que haja um diagnóstico precoce de NBKV, antes das alterações irreversíveis do rim [4,33]. No entanto deve ser sempre considerado o risco individual de rejeição [33,34].

Após a redução da imunossupressão, a NBKV pode ter dois comportamentos diferentes: desaparecimento da infecção e dos efeitos citopáticos do vírus na biopsia e na urina, ou persistência da replicação viral com associação das alterações tubulares [40].

Uma monitorização intensa e eficaz, associada a uma rápida redução da imunossupressão após a detecção da viremia persistente por BKV, pode levar à resolução da maioria das viremias e à prevenção do desenvolvimento de NBKV clinicamente significativas [32,40].

1.4. DIAGNÓSTICO DO POLIOMAVÍRUS BK

O diagnóstico de NBKV é difícil de fazer, principalmente devido aos problemas de diagnóstico diferencial com a rejeição aguda e com a toxicidade medicamentosa.

Os métodos de diagnóstico válidos incluem a histopatologia através da biopsia renal do enxerto, a detecção do *DNA* do BKV no plasma e na urina por “Polymerase Chain Reaction” (PCR), “Reverse transcription – Polymerase Chain Reaction” (RT-PCR), “Quantitative – Polymerase Chain Reaction” (QPCR) e pesquisa de células *decoy* na citologia urinária. Para além destes, existem ainda os métodos de diagnóstico confirmatório como a imunohistoquímica (IHQ), a hibridização *in situ* (HIS) e a microscopia electrónica [7].

Qualquer um destes testes é sensível para detectar a infecção activa por PV, mas perde especificidade em relação à nefropatia porque o vírus detectado pode ter origem em qualquer parte do tracto urinário. A detecção do *DNA* do BKV no plasma ou no sangue, talvez seja o melhor indicador de nefropatia. À medida que a infecção se intensifica, os marcadores da replicação viral aumentam, tendo sido sugeridos valores limite para predizer a NBKV. Existe, no entanto, uma considerável sobreposição destes valores em pacientes sem NBKV, com NBKV activa e NBKV resolvida. Deste modo, a biopsia renal do transplante continua a ser o critério de eleição para o diagnóstico de NBKV [34], apesar de alguns problemas de diagnóstico diferencial com outras patologias [21].

Tendo em atenção as limitações dos diferentes métodos, o diagnóstico de NBKV deve ser feito com base na combinação da presença de células *decoy* na urina, quantificação do vírus na urina ou no sangue e os achados de nefrite intersticial na biopsia histológica [2,40]. Como método de rastreio pode ser utilizada a citologia urinária em associação com a PCR, uma vez que a conjugação destes dois resultados tem um valor preditivo negativo de 100% [6].

A identificação precoce do vírus faculta a oportunidade de intervenção médica, através de uma redução da imunossupressão, como um esforço para controlar a replicação do BKV e desta forma prevenir a NBKV.

1.4.1. Histologia

Macroscopicamente, um rim perdido por infecção por BKV apresenta uma diminuição ligeira do tamanho, é sólido, tem uma junção cortico-medular mal definida e superfície granular. As anomalias macroscópicas não são específicas e são similares às alterações encontradas em outras doenças associadas com fibrose e atrofia [38,13].

No que diz respeito à avaliação microscópica, os sinais causados pela infecção produtiva do BKV encontram-se, caracteristicamente, nas células epiteliais dos ductos colectores, túbulos renais e cápsula de Bowman's, e nas células de transição da pelvis renal [13], sendo o mais importante no diagnóstico da NBKV, as alterações citopáticas do vírus [25].

A infecção por BKV leva a um infiltrado dos tecidos por polimorfonucleares e mononucleares e a uma inflamação dos túbulos renais, que é muito similar ao padrão visto nas rejeições agudas do rim transplantado [37]. Observam-se ainda inclusões intranucleares, necrose tubular e inflamação intersticial (Figura 5) [2,21,37], sendo que o diagnóstico diferencial deve ser feito com base na presença de células com inclusões virais, que resultam da conjugação de dois processos: a acumulação de viriões recentemente formados no núcleo da célula e da subsequente lise celular [4,25,37].

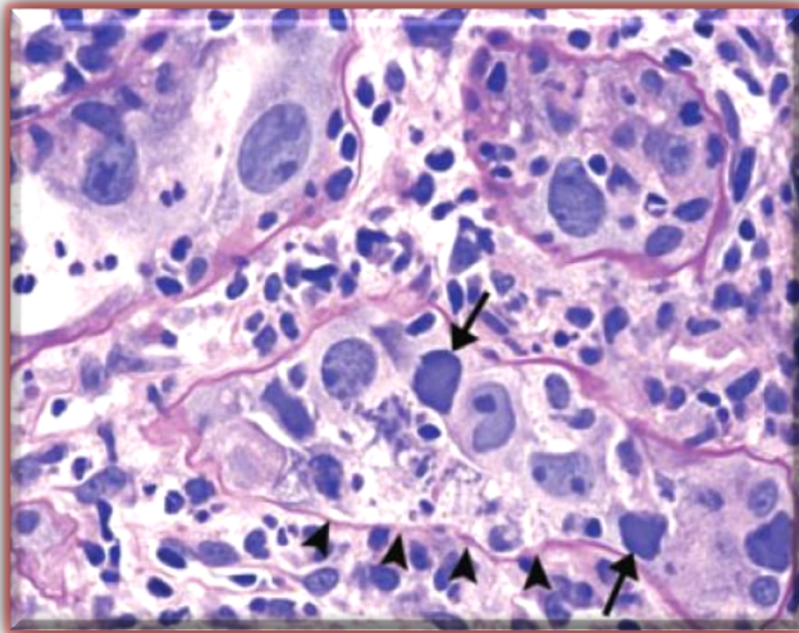


Fig. 5 – NBKV. Observam-se células tubulares epiteliais com corpos de inclusão viral (↓), lise celular e desnudação da membrana basal tubular (▼). Interstício com edema e marcado infiltrado inflamatório [37].

Existem quatro tipos de inclusões intranucleares, que são passíveis de serem observadas tanto na histologia como na citologia (Figura 6) [4,21,23,38].

As inclusões tipo 1, são basófilas, têm um aspecto amorfo em vidro fosco com um aro de cromatina periférico; este tipo de inclusão é a mais frequente na NBKV e é encontrada na linha urotelial da pélvis renal [4,21,23,38].

As inclusões tipo 2, são eosinófilas e granulares e estão rodeadas por um halo incompleto, tipo CMV [4,21,23,38].

Nas inclusões do tipo 3, observa-se um aspecto finamente granular e a perda do halo [4,21,23,38].

Por último temos as inclusões do tipo 4, que apresentam um marcado aumento nuclear com cromatina em agregados irregulares e nucléolo proeminente. Por vezes as inclusões do tipo 4 são difíceis de distinguir das atipias reparativas do epitélio tubular [4,21,23,38].

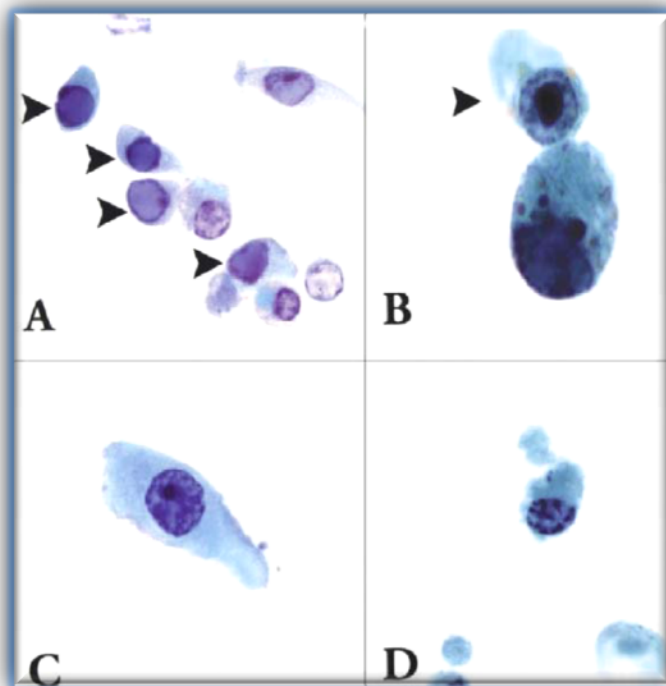


Fig. 6 – Inclusões virais. A) tipo 1, B) tipo 2, C) tipo 3 e D) tipo 4 [13].

As células infectadas são vistas apenas ocasionalmente no epitélio glomerular e as células endoteliais, mesenquimais e inflamatórias não são infectadas [21].

As alterações nucleares induzidas pela replicação virica são encontradas em quase todos os casos de NBKV, no entanto, devem estar limitadas aos ductos colectores, na medula [38].

Apesar das inclusões nucleares ajudarem no diagnóstico diferencial, nem sempre é fácil fazer a distinção entre o efeito da patologia virica e as alterações causadas quer pela rejeição aguda quer por outros vírus, como o Citomegalovírus, o Adenovírus e o Herpesvírus, sendo necessária a demonstração e confirmação das alterações citopáticas provocadas pelo vírus através de técnicas de IHQ, HIS ou Microscopia Electrónica [7,21,25,27,37]. Estas técnicas são apropriadas para confirmar a presença de um determinado vírus, nomeadamente de estirpes patogénicas, se já houver uma suspeita de infecção viral, aquando da observação por microscopia óptica [37].

A NBKV está associada a vários graus de inflamação intersticial e fibrose, o que levou à criação de um modelo de progressão histológica com a criação de três estádios de NBKV: A; B e C [4,8,13,34,37,38,44].

No estádio A, precoce não inflamatório, os sinais de activação são visíveis no córtex e/ou medula do rim e caracterizam-se por inclusões nucleares, que podem excepcionalmente não aparecer, sendo necessária a confirmação por IHQ ou HIS. Este padrão caracteriza-se pelo efeito citopático viral, inflamação mínima ou ausente e interstício normal (Figura 7) [4,8,13,34,37,38,44].

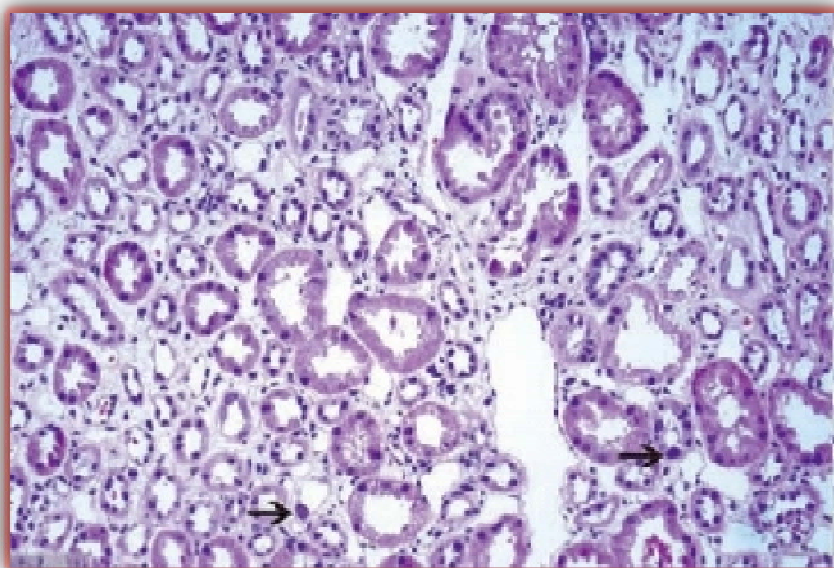


Fig. 7 – NBKV estádio A (HE). Raras inclusões intranucleares do PV em alguns túbulos (setas), localizadas na junção cortico-medular. Sem evidência significativa de lesão tubular e sem inflamação [13].

O estádio B, destrutivo e inflamatório, corresponde a lesão citopática ou citolítica com inflamação intersticial, os sinais de activação encontram-se no córtex e / ou medula renal e consistem em lise celular, ruptura das membranas basais, edema intersticial, infiltrado de células inflamatórias (linfócitos B e T e células plasmáticas), neutrófilos proeminentes e adjacentes aos túbulos gravemente lesionados, fibrose intersticial e atrofia tubular. Este padrão é subdividido em B1, B2 e B3, tendo em atenção a percentagem de envolvimento da biopsia renal, menor ou igual a 25%, maior que 25% e menor que 50% e, maior ou igual a 50%, respectivamente (Figura 8) [4,8,13,34,37,38,44].

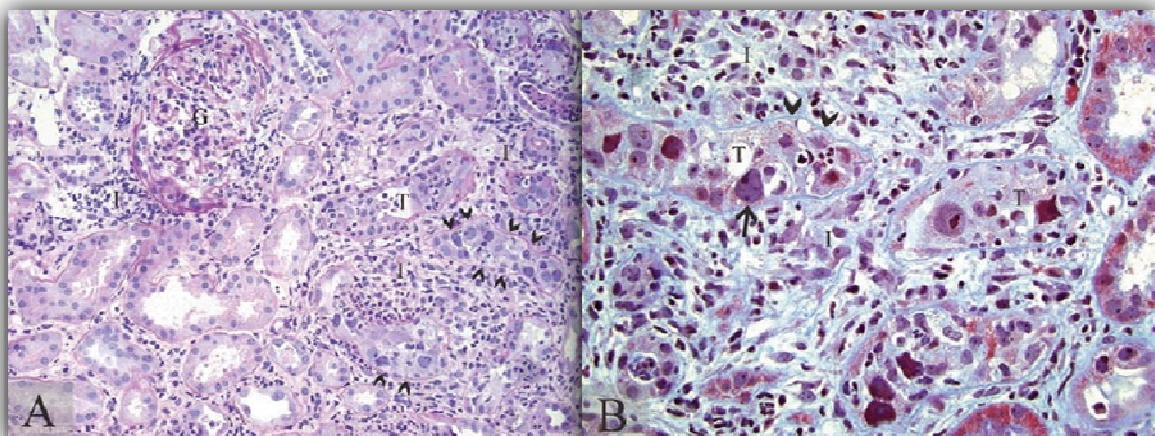


Fig. 8 – NBKV estadio B. (A) *Periodic Acid Schiff* (PAS), (B) Coloração tricrômica. A NBKV é rapidamente caracterizada por corpos de inclusão viral intranuclear (seta em B) e marcadas lesões tubulares agudas. Observa-se também ruptura da membrana basal dos túbulos (cabeça de seta em A e B) e tubulite focal (T = túbulos). O Interstício (I) mostra edema e infiltrado de células inflamatórias; fibrose intersticial imperceptível e glomérulos normais [13].

O estadio C, esclerosante tardio, caracteriza-se por sinais de replicação vírica associados a lesões das células epiteliais tubulares. A inflamação intersticial pode variar de mínima a marcada, e a fibrose intersticial marcada e atrofia tubular secundária à indução vírica, envolve mais de 50% da amostra tecidular. As alterações do padrão C são mais pronunciadas no córtex renal mas também podem ser vistas na medula (Figura 9) [4,8,13,34,37,38,44].

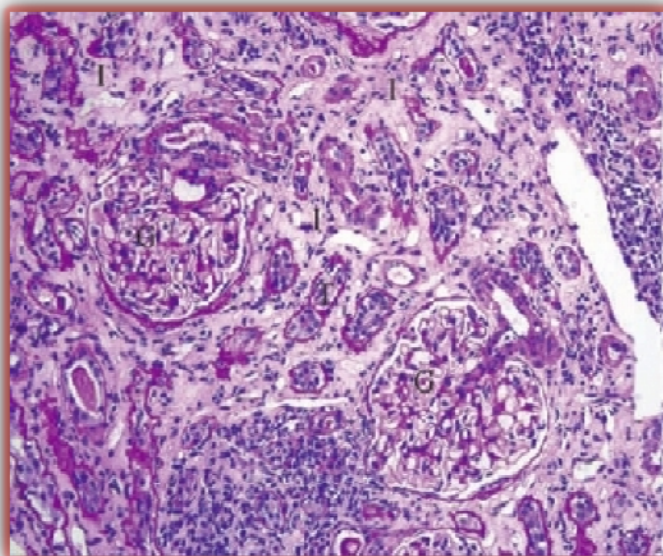


Fig. 9 – NBKV estadio C. *Periodic Acid Schiff* (PAS). A NBKV esclerosante é caracterizada por uma fibrose intersticial difusa (I) e uma atrofia tubular envolvendo $\geq 50\%$ da biopsia, assim como vários graus de inflamação; os glomérulos (G) são pouco nítidos [13].

Quando a infecção é detectada no último estadio as possibilidades de recuperação são muito pequenas e a evolução para uma situação de perda do enxerto é a regra. Por este motivo, é essencial a detecção precoce destas lesões [22].

1.4.2. Citologia

Na Citologia Urinária, o diagnóstico do Poliomavirus (PV) é feito através da presença de células *decoy*, que podem ser facilmente detectadas em amostras citológicas coradas pelo Papanicolaou ou por Hematoxilina – Eosina (HE). As células *decoy* (células armadilha) (Figura 10), assim denominadas devido à possibilidade de confundir as suas alterações atípicas com alterações malignas, são células epiteliais caracterizadas por um aumento do volume nuclear, núcleos basófilos, grandes inclusões virais com aspecto de vidro fosco, cromatina condensada e halo perinuclear. [4,7,23,25,24,43,].

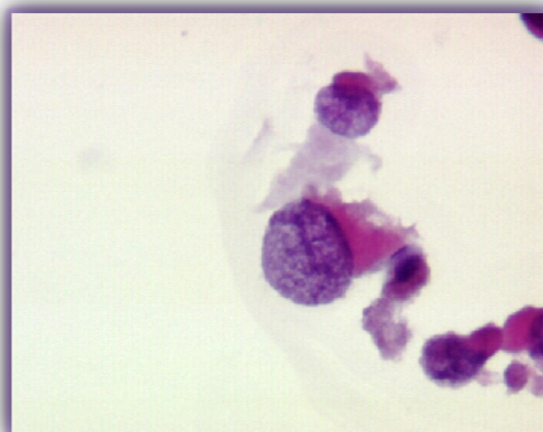


Fig. 10 – Células *decoy* em citologia urinária, processada pelo *ThinPrep*® 2000 e coradas por HE (40x).

Estudos de pesquisa de PV em citologia urinária mostraram que a incidência de urinas positivas para poliomavírus reporta a uma taxa de 20 a 40% [42,43], havendo uma prevalência aumentada nos homens quando comparada com as mulheres. Por outro lado, verifica-se uma relação significativa entre aumento da idade e aumento de pacientes positivos para PV, sendo mais frequente em pacientes entre os 40 e os 49 anos e menos frequente em pacientes com menos de 20 anos. Quando se faz a correlação de urinas positivas para PV com o período pós-operatório verifica-se que a prevalência de infecção por PV aumenta após períodos pós-transplante prolongados (> 6 meses) [42].

Dos estudos realizados conclui-se que a citologia urinária é um método de fácil execução e de baixo custo, podendo ser considerada uma boa ferramenta na detecção do PV activo, devendo, por isso, ser usada por rotina como método de rastreio [4,5,7,42,43].

Embora para o diagnóstico de infecção por PV activo seja necessário detectar a presença de partículas virais no sangue por PCR, um estudo de 2004 sugere que o diagnóstico de PV pode ser feito com base na persistência de células *decoy* na urina, de forma tão eficaz como a detecção de partículas virais no sangue, identificando desta forma os pacientes com risco para desenvolver NBKV [4,43].

Segundo alguns autores, embora uma célula *decoy* seja suficiente para marcar a activação do PV, na prática clínica foi estabelecido um limite arbitrário de mais de 10 células *decoy* por amostra em meio líquido, para que se possa distinguir um paciente *decoy* positivo, de um *decoy* negativo [6,37]. Qualquer outro tipo de quantificação de células *decoy* não providencia informações clinicamente relevantes, uma vez que o número de células *decoy* não é directamente proporcional ao grau de risco [6,37]. A combinação de um fundo inflamatório com mais de 10 células *decoy* e a disfunção do enxerto é descrita como a marca mais específica de NBKV [6].

A citologia urinária é um método sensível para identificar a infecção por PV no tracto urinário, com aproximadamente 100% de sensibilidade; no entanto, a sua especificidade é de cerca de 70% [5,21,46], com um valor preditivo positivo baixo para NBKV (25 a 30%) [2,5,21,24,37,43,46]. Segundo Santos *et al* (2004), a persistência de células *decoy* na urina aumenta o valor preditivo positivo para o diagnóstico de NBKV [43].

A ausência de células *decoy*, na urina, tem um valor preditivo negativo de 100%, excluindo desta forma a presença de NBKV [24,37,42,43].

Apesar da citologia ser um método bastante válido no que diz respeito ao diagnóstico do PV, há que ressaltar que para além do baixo valor preditivo positivo esta técnica apresenta outras desvantagens. Embora seja relativamente fácil detectar a presença de células epiteliais com alterações citopáticas provocadas pelo vírus, não é possível fazer a distinção entre BKV e JCV

[4,21,25], assim como também não se consegue fazer a diferenciação entre células *decoy* provenientes dos túbulos renais ou de reativação extra-renal, em particular do urotélio [4,13,21,25]. Por outro lado, as características morfológicas das células *decoy* são muito similares às das células malignas, o que pode levantar problemas de diagnóstico diferencial entre PV e Carcinoma, assim como são sobreponíveis às de outros vírus, como é o caso do CMV e do adenovírus. Para além destas desvantagens, relacionadas com o diagnóstico, há ainda que ter em atenção as condições em que a amostra se encontra, isto é, a degeneração celular associada à infecção viral ou a uma má preservação da amostra [4,21,25].

No caso de alterações suspeitas mas não conclusivas de infecção por PV, deve-se repetir a citologia em algumas semanas, para evitar falsos-positivos, ou então, utilizar técnicas moleculares para confirmar a suspeita de infecção virica. Os métodos moleculares conseguem identificar e quantificar o material viral, de uma forma adequada, mesmo na presença de marcadas alterações degenerativas ou de amostras que tenham sido guardadas por muitos dias [4].

1.4.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

A PCR é um método eficiente e sensível para o diagnóstico de BKV, tendo sensibilidade de 100%, especificidade de 88% e valor preditivo positivo de 85%, conseguindo diferenciar entre vírus BK e JC [4,5,6,7,12,27,25,].

Enquanto a PCR demonstra viruria em 30% das amostras de pacientes com transplante renal, na citologia urinária apenas 12 a 16% das amostras apresentam células *decoy* [4,25].

A PCR fornece dados quantitativos que permitem uma gestão da terapia farmacológica pelo clínico, uma vez que não existe uma terapia antiviral específica para o BKV e a redução da imunossupressão depende da carga viral na urina e no plasma [7]. Valores repetidos acima de 10^7 cópias de BK/ml na urina, são considerados associados com a NBKV [4,25,47].

Apesar da mais-valia da PCR, a determinação da virúria apenas por este método tem um valor clínico limitado [25,47], sendo que os resultados devem ser

interpretados com cuidado [7,37,39]. Apenas sinais fortes de amplificação do *DNA* vírico (mais de 10 cópias do vírus BK por célula equivalente), em conjugação com a imagem clínica, e a demonstração das alterações citopáticas induzidas pelo vírus através da histopatologia, podem ser usados para confirmar o diagnóstico de NBKV e distinguir uma infecção produtiva clinicamente significativa duma infecção latente clinicamente insignificante. [4,37,39].

Devido à alta sensibilidade e especificidade, a PCR é uma mais-valia no diagnóstico diferencial do JCV e BKV, possibilitando também a identificação e quantificação de *DNA* viral em amostras degeneradas. No entanto, é um método relativamente dispendioso, principalmente quando comparado com a análise do sedimento urinário.

1.4.4. Imunohistoquímica

No que diz respeito à confirmação da infecção por PV através da IHQ, utiliza-se um anticorpo de um patogénio ou vírus relacionado. No caso de BKV, o patogénio relacionado é o SV40, sendo o seu anticorpo o SV40 TAg. O SV40 não é visto como um patogénio natural no homem, mas tem 70% de semelhança com os vírus humanos BK e JC, o que permite uma reacção cruzada entre eles e desta forma uma imunomarcacção visível ao microscópio óptico [7,21,27].

Num estudo realizado em 2005 [48], foi feita a imunomarcacção de citopreparações de urina com o anticorpo do SV40 (SV40 T-ag), contadas as células epiteliais positivas para o antígeno SV40 T-ag e comparadas as contagens com as obtidas para as células *decoy*, encontradas na urina de rotina e na biopsia histológica do rim transplantado. Este estudo demonstrou, por um lado, que as células epiteliais infectadas e a taxa de infecção podem ser estimadas por contagem semiquantitativa e, por outro, que o elevado número de células positivas para o SV40 T-ag, na urina, está correlacionado com a severidade da infecção clínica e o estado do transplante. Neste estudo também se verificou haver uma forte correlação entre os achados na urina e na biopsia, no entanto, o número de células infectadas foi maior na urina do que na biopsia [48].

Apesar da IHQ poder dar uma reacção positiva em células que aparentemente eram normais, visto que a produção de antigénio T precede a formação de corpos de inclusão viral intranuclear, ajudando assim no diagnóstico, também tem desvantagens. Uma das desvantagens está relacionada com o antigénio T do PV e a sua expressão apenas durante o estadio precoce da replicação viral intranuclear, levando a que alguns tipos de inclusões representando a fase tardia, possam ser negativas para a imunomarcação. [13,38]. A outra desvantagem prende-se com o facto de o SV40 T-ag reconhecer tanto o BK como JC, o que impede uma distinção entre estes dois tipos de PV, implicando a utilização de técnicas mais específicas [7,13,27].

1.4.5. Hibridização *In Situ*

Embora, actualmente, a IHQ através do anticorpo SV40 TAg seja o método mais utilizado para confirmar a infecção por PV [4], ele não nos dá a distinção entre BKV e JCV, sendo possível recorrer a métodos mais sensíveis como é o caso da hibridização *in situ* [7, 37]. A HIS é um método que localiza o *DNA* do BKV nas células [7,27], proporcionando informação morfológica e observação da expressão genética [49].

A HIS foi descrita pela primeira vez em 1969, mas só na década de 80 é que começou a despertar o interesse da área médica [49]. Esta técnica envolve o uso de uma sonda quimicamente complementar para a qual o patógeno tem afinidade, formando híbridos [7,27], detecta viriões maduros e, ao contrário da IHQ, não tem marcação exclusivamente intranuclear, marcando também densos agregados víricos, intratubulares [13].

A grande vantagem da HIS é o facto de se poder localizar com precisão no tecido/célula, um gene específico ou os seus transcritos, permitindo uma avaliação do ponto de vista morfológico [49] (Figura 11).

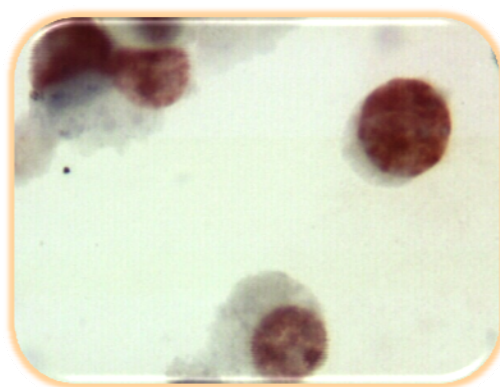


Fig. 11 – Células *decoy* em urina processada por CISH (40x).

Outras técnicas de biologia molecular, como é o caso da PCR, permitem a detecção de *mRNA* ou *DNA* extraídos de tecidos/célula, com uma sensibilidade superior à da HIS, uma vez que permite gerar um sinal mais intenso com um menor número de cópias. No entanto, não permite associar a presença de *DNA* ou *mRNA* de microorganismos com a morfologia ou com os processos patológicos [49].

Apesar da mais-valia da HIS no diagnóstico diferencial entre BKV e JCV, ela não é muito utilizada como método de diagnóstico, não se tendo inclusive encontrado bibliografia com estudos comparativos para o BKV.

1.4.5. Microscopia Electrónica

A microscopia electrónica também pode ser utilizada para confirmar um diagnóstico de BKV, sendo muito sensível na detecção dos viriões do PV, no entanto, o facto de se encontrar as partículas víricas não é por si só suficiente para um diagnóstico NBKV, uma vez que o aspecto ultraestrutural do BKV é pouco típico. Por outro lado, importa realçar o facto de não ser possível distinguir por este método o Vírus BK do Vírus JC [7].

Este método é pouco praticável, quando comparado com outros métodos descritos, devido à sua baixa sensibilidade e aos elevados custos [4].

2. OBJECTIVO

A citologia urinária é considerada uma excelente ferramenta no rastreio do PV, não só por ser um método de fácil execução e barato, mas também porque a persistência de células *decoy* em urinas de repetição identifica pacientes com potencial de risco para NBKV. Por outro lado, de acordo com o “algoritmo de rastreio de pacientes e protocolos de monitorização”, um paciente com uma citologia urinária processada pelo método de monocamada, com mais de 10 células *decoy* é indicado para biopsia renal, sem que haja necessidade de confirmação por PCR [37]. Embora seja relativamente fácil detectar a presença de células *decoy* na urina, não é possível fazer a distinção entre BKV e JCV, assim como o diagnóstico diferencial entre células *decoy* e células malignas nem sempre é fácil.

Tendo em atenção as características de cada uma das metodologias utilizadas no diagnóstico do BKV, em indivíduos transplantados, e dada a sua importância para o sucesso do transplante, é o principal objectivo deste trabalho investigar se o método de hibridização *in situ* utilizando células de urina poderá ser uma ferramenta útil, quando comparada com a citologia urinária. Pretende-se também investigar a incidência do PV na citologia urinária em relação às variáveis clínico-patológicas como sexo, idade e período pós-transplante.

Desta forma pretendemos investigar se é possível, através de uma combinação de métodos, diminuir o risco de falsos negativos para PV na urina, e de falsos positivos por confusão com as células malignas, assim como permitir a distinção entre BKV e JCV.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram submetidas a estudo, um total de 66 urinas referentes a pacientes pós-transplantados, para pesquisa de células *decoy*, recebidas no Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António (CHP-HSA), entre Abril e Junho de 2009. As amostras foram todas processadas e avaliadas pelo método de citologia urinária, tendo sido efectuada hibridização *in situ* com cromogénio (CISH) nas 21 amostras cujo diagnóstico citológico foi positivo ou sugestivo de PV (≥ 1 célula) e em 14 amostras negativas para PV que apresentavam células uroteliais.

As urinas submetidas a estudo correspondem a transplantes renais efectuados entre Junho de 1989 e Maio de 2009 em pacientes cujas idades variam entre os 23 e os 73 anos e que efectuaram colheitas de urina de rotina para despiste de células *decoy*. Do total de amostras 51 (77,3%) pertencem a indivíduos do sexo masculino.

As colheitas de urina foram feitas durante as consultas de Nefrologia e enviadas em frascos esterilizados sem qualquer tipo de preservador, para o Serviço de Anatomia Patológica do CHP-HSA.

Uma vez no serviço a urina foi homogeneizada e dividida em partes iguais, metade para fazer o processamento da citologia urinária e a outra metade para CISH.

3.1. Processamento da citologia urinária para pesquisa de células *decoy*

As amostras citológicas foram processadas de acordo com o protocolo descrito no manual da qualidade, do Serviço de Anatomia Patológica do CHP-HSA.

Colocou-se a totalidade da amostra num tubo de Falcon e centrifugou-se a 1500 r.p.m durante 10 minutos; rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento. A totalidade do sedimento foi colocada no frasco de *ThinPrep Non-Gyn* contendo a solução *PreservCyt®* (Cytoc Corporation, Malbotough, MA, USA) e deixou-se repousar durante pelo menos 15 minutos. A amostra foi processada

no *ThinPrep*® 2000 usando o programa para citologia não ginecológica. Deixou-se fixar durante pelo menos 10 minutos em álcool a 96% e corou-se pela Hematoxilina-Eosina (HE) (Shandon Gill 2 Hematoxyline, Ref 6765008, Thermo Scientific, Pittsburgh, PA; Shandon Eosin Y Aqueous, Ref 6766010, Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA)

As amostras foram observadas ao microscópio óptico e classificadas como positiva (≥ 1 célula *decoy*), sugestiva para PV (≥ 1 célula com alterações sugestivas de PV) ou negativa para PV. Foi ainda quantificado o número de células com efeito citopático provocado pelo PV. Com base em estudos feitos por Drachenberg *et al* [26,44,], as amostras urinárias foram classificadas da seguinte forma: 1 a 4 células infectadas (1), 5 a 10 células infectadas (2), mais de 11 células infectadas, mas representando a minoria de células no sedimento (3) e a maioria das células representadas infectadas (4).

3.2. Preparação das amostras para hibridização *in situ* com cromogénio

O pré-tratamento das amostras, foi efectuado com base no protocolo fornecido no “II Curso Teórico-prático de Hibridación *In Situ* Fluorescente con las Sondas Urovision (para la detección de alteraciones cromosómicas en muestras urológicas)”, realizado no Hospital del Mar – Barcelona. Deste modo, repartiu-se a amostra por tubos de ensaio para que ficassem equilibrados, tendo em atenção o volume total da mesma. Uma vez distribuída, centrifugou-se a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e colocou-se o sedimento apenas num dos tubos. Adicionou-se *Phosphate Buffer Saline* (tampão PBS) (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, Ref TA-125-PB) na proporção de 1 de tampão comercial para 9 de água destilada, até perfazer 10 ml e voltou-se a centrifugar a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante, deixando aproximadamente 1 ml juntamente com o sedimento. Adicionou-se 9 ml de uma solução de Carnoy (1parte de ácido acético glacial para 3 partes de metanol) (ácido acético, Merck, Ref 106009; metanol, Merck, Ref 100063) e voltou-se a centrifugar a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. O sobrenadante foi rejeitado,

deixando-se aproximadamente 1 ml para se proceder à preparação dos esfregaços.

Colocou-se na citocentrífuga cytospin 3 (Shandon) o complexo citoclip, lâmina adesivada (Star Frost, Medite), filtro (Shandon Filter Cards, Ref 5991022) (Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA) e citofunil, por esta ordem. Homogeneizou-se a amostra e colocou-se entre 5 a 9 gotas no citofunil, consoante o sedimento macroscópico observado. Citocentrifugou-se a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. As lâminas foram retiradas e colocadas em porta-lâminas de plástico, envolvidos em papel de alumínio, para evitar a condensação, e congeladas a -70°C.

3.3. Hibridização *in situ* com cromogéneo

A hibridização *in situ* com cromogéneo foi efectuada utilizando o *UltraSensitive® Enhanced Horseradish Peroxidase-AEC In Situ Detection System* (Enzo, Farmingdale, NY).

Todos os reagentes, à excepção do tampão de lavagem e do *Color Reaction Mixture*, são prontos a usar.

Para preparar o tampão de lavagem dissolveu-se uma embalagem de *Wash Buffer Salts* (Enzo Life Sciences Inc, Farmingdale, NY) num litro de água destilada. A solução deve ter um pH de $7,1 \pm 0,1$ e deve ser guardada no frigorífico, quando não estiver em uso. As lâminas com o esfregaço foram descongeladas e deixadas à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos, para eliminar qualquer vestígio de água. Durante estes 30 minutos, colocou-se o tampão de lavagem a aquecer, na estufa a 37°C. Uma vez aquecido, incubaram-se as lâminas a 37°C durante 15 minutos. Após os 15 minutos, as lâminas foram retiradas do tampão de lavagem e desidratadas. A desidratação foi efectuada passando as lâminas por uma sequência de água destilada, álcool a 50%, álcool a 70% e álcool a 100%, respectivamente. Foram efectuadas duas passagens de um minuto cada, em cada um dos passos. Para que a desidratação fosse completa e não ficasse qualquer vestígio de água, as lâminas foram colocadas na estufa a 37°C, durante aproximadamente 10 minutos. Após a desidratação procedeu-se à hibridização e detecção dos híbridos formados.

Adicionou-se a cada esfregaço 6 µl de *BK Virus Bioprobe® Labeled Probe* (Enzo Life Sciences Inc, Farmingdale, NY), cobriu-se com uma lamela 22x22mm e selou-se com cola.

As lâminas foram colocadas no termociclador (Vysis; HyBrite™) e incubadas, inicialmente a 95°C durante 9 minutos, para se que dê a desnaturação e, em seguida a 37°C durante 2h45m para hibridar. Retiraram-se as lâminas, removeu-se a cola e a lamela e lavou-se em tampão de lavagem durante 5 minutos. Colocou-se o *Post Hybridization Reagent* e deixou-se a incubar a 37°C durante 10 minutos. Após os 10 minutos, lavou-se as lâminas em tampão de lavagem e colocou-se em *Antibody Blocking Buffer*, 10 minutos a 37°C e voltou-se a lavar em tampão de lavagem. Adicionou-se *Rabbit anti-Biotin* durante 20 minutos a 37°C, lavou-se em tampão de lavagem e incubou-se em *Bio-Goat anti-rabbit IgG*, durante 20 minutos a 37°C. Lavou-se novamente em tampão de lavagem e levou-se a incubar a 37°C durante 30 minutos, no *Detection Reagent*, tendo-se efectuado de seguida a lavagem das lâminas em tampão de lavagem. Durante esta lavagem procedeu-se à preparação da *Color Reaction Mixture*, tendo-se adicionado 3 gotas de *AEC Reagent* a um frasco de *Reaction Buffer / Substrate Reagent*. Depois de bem lavadas foram colocadas na *Color Reaction Mixture* durante 20 minutos a 37°C, evitando a exposição à luz. Lavou-se bem em tampão de lavagem, seguido de água destilada, contrastou-se com *Blue Counterstain* durante 2 minutos à temperatura ambiente e voltou-se a lavar em tampão de lavagem e água destilada. As lâminas foram montadas com um meio de montagem aquoso, que neste estudo foi o *Faramount Aqueous Mounting Médium* (DakoCytomation; Ref 53025).

Durante todo o procedimento teve-se alguns cuidados essenciais para garantir resultados finais de qualidade. O primeiro cuidado que se teve foi com as lavagens em tampão de lavagem, garantindo uma boa lavagem das lâminas entre cada passo. Para evitar a secagem das lâminas durante a incubação a 37°C, foi utilizada uma câmara húmida e por último garantir que os reagentes a utilizar se encontravam à temperatura ambiente.

3.4. Análise estatística

A análise estatística foi efectuada com recurso ao *Software SPSS® Statistics 17.0* (2008), tendo sido efectuados métodos de estatística univariada e bivariada.

4. RESULTADOS

Das 66 amostras de urina correspondentes a pacientes com transplante renal (resultados no Anexo A), 51 (77,3%) pertencem a indivíduos do sexo masculino, enquanto as restantes 15 (22,7%) são de pacientes do sexo feminino.

Do total das 66 amostras observaram-se células *decoy* (Figura 12), na citologia urinária, em 16 casos (24,2%), sendo que 15 (93,8%) eram homens e 1 (6,3%) mulher, e 5 casos (7,6%) foram sugestivos de infecção por PV, 2 (40%) em mulheres e 3 (60%) em homens (Figura 13). Nas mulheres, as citologias positivas ou sugestivas para PV representam 20% da amostra, enquanto nos homens correspondem a 35,3%.

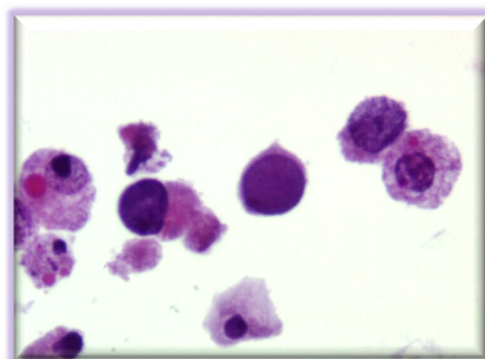


Fig. 12 – Citologia urinária positiva para PV, processada pelo *ThinPrep 2000®* e coradas por HE (40x).

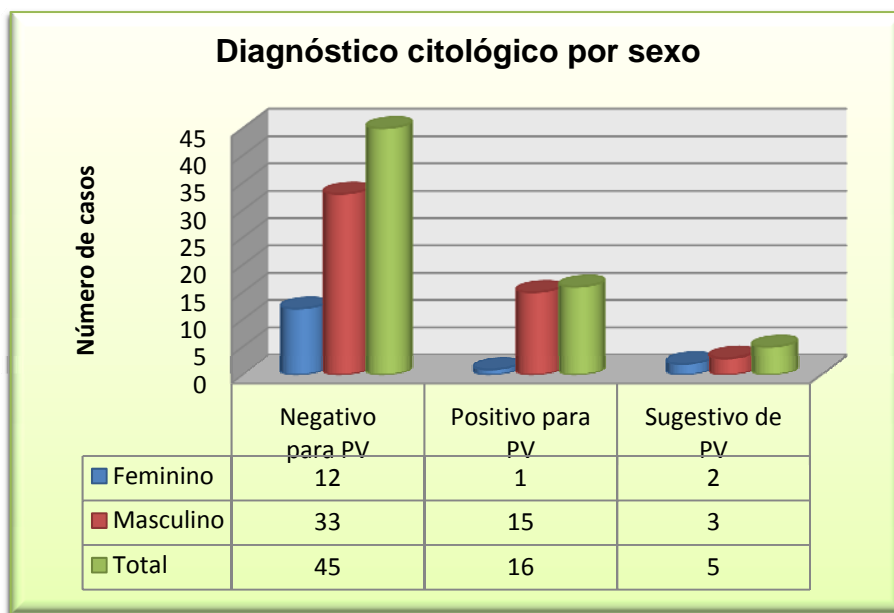


Fig. 13 – Distribuição do diagnóstico citológico por sexo

Em relação à idade dos pacientes (média 43,09; desvio padrão 11,31; mediana 44,5), verificou-se que o grupo etário onde aparece mais frequentemente citologias urinárias com positividade para PV é 51-60 anos com 8 casos (53,3%) num total de 15 citologias e 1 (6,7%) sugestivo de PV, seguido do grupo 41-50 anos com 6 casos (31,6%) positivos e 1 (5,3%) sugestivo, em 19 possíveis. A faixa etária onde existem menos casos de PV é a <31 anos com apenas 1 caso (8,3%) sugestivo de PV (Figura 14).

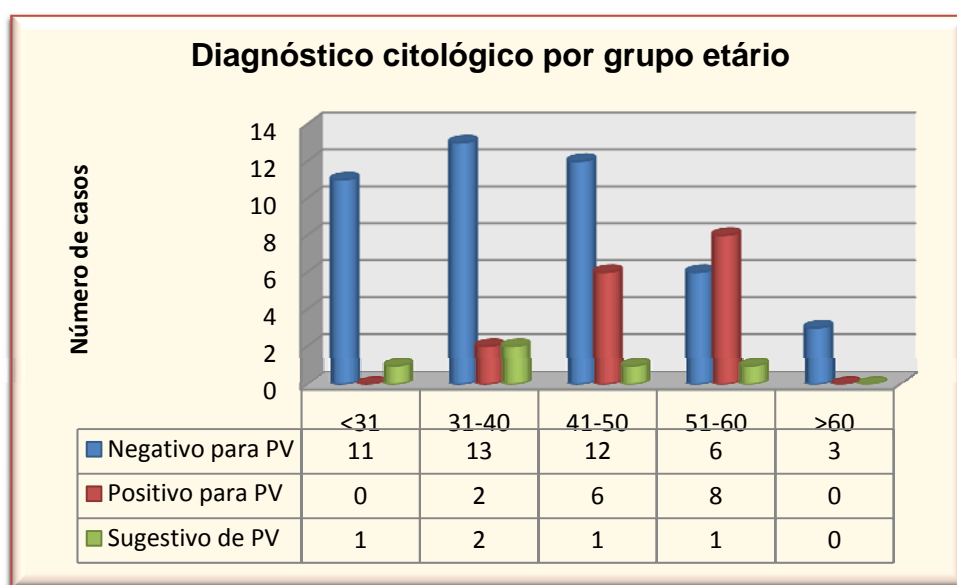


Fig. 14 – Distribuição do diagnóstico citológico por grupos etários

Quando comparamos os resultados da citologia urinária com o período pós-transplante, verificamos que dos 9 casos com 1 a 3 meses de transplante, 2 (22,2%) foram positivos para células *decoy* e 2 (22,2%) sugestivo de PV. No período de 3 a 6 meses dos 12 casos, 4 (33,3%) apresentaram células *decoy* e 2 (16,7%) foram sugestivos de PV. Por último temos os pacientes com mais de 6 meses de transplante, onde dos 45, 10 (22,2%) foram positivos para PV e 1 (2,2%) foi sugestivo. No presente estudo não existem pacientes com menos de um mês de transplante (Figura 15).

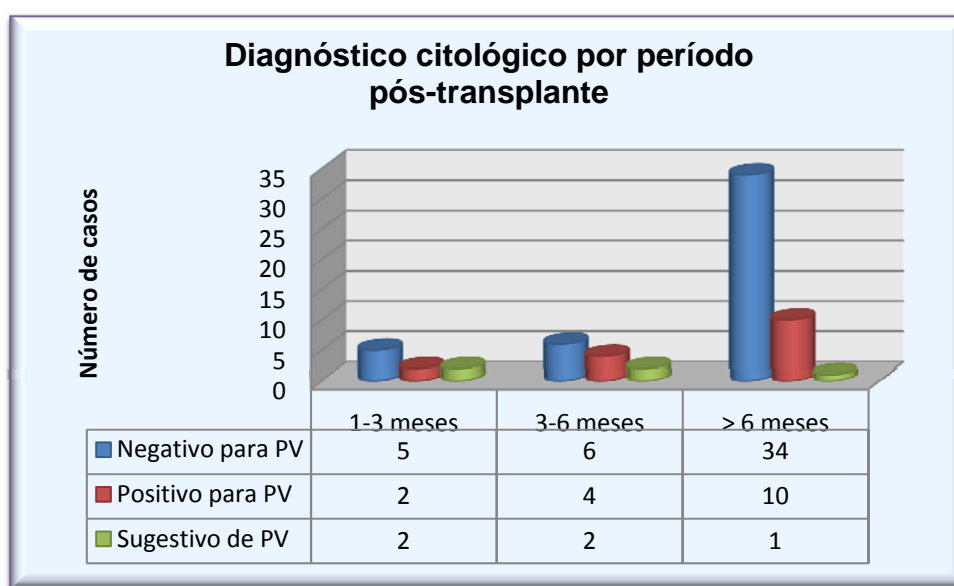


Fig. 15 – Distribuição do diagnóstico citológico por período pós-transplante

Da visualização microscópica e quantificação do número de células positivas ou sugestivas para PV verificou-se que, 6 (28,6%) casos tinham entre 1 a 4 células *decoy*, 2 (9,5%) casos 5 a 10 células *decoy*, com mais de 11 células *decoy* infectadas mas em minoria no sedimento eram 6 (28%) casos e, com mais de 11 células infectadas mas em maioria no sedimento (Figura 16), 7 (33,3%) casos. Os 5 casos sugestivos encontram-se todos no grupo de 1 a 4 células infectadas (Figura 17).

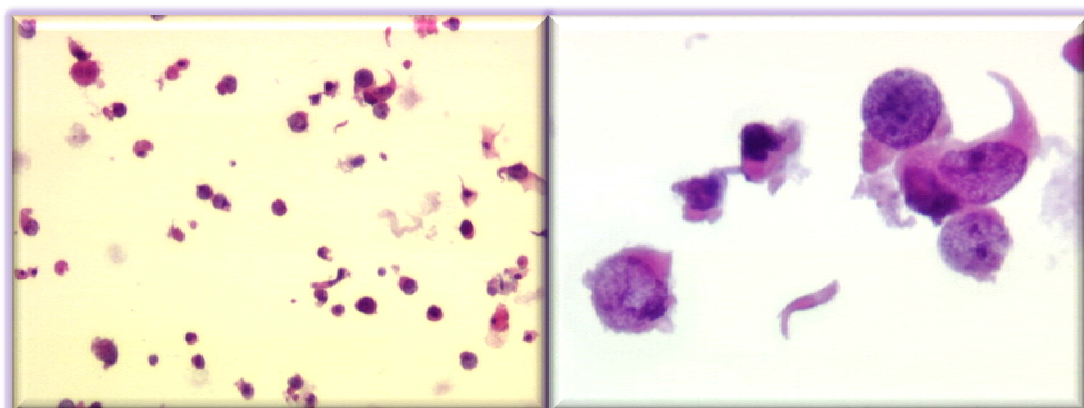


Fig. 16 – Citologia urinária positiva para PV, com mais de 11 células infectadas no sedimento, processada pelo *ThinPrep 2000®* e coradas por HE. Esquerda (10x) e direita (40x).

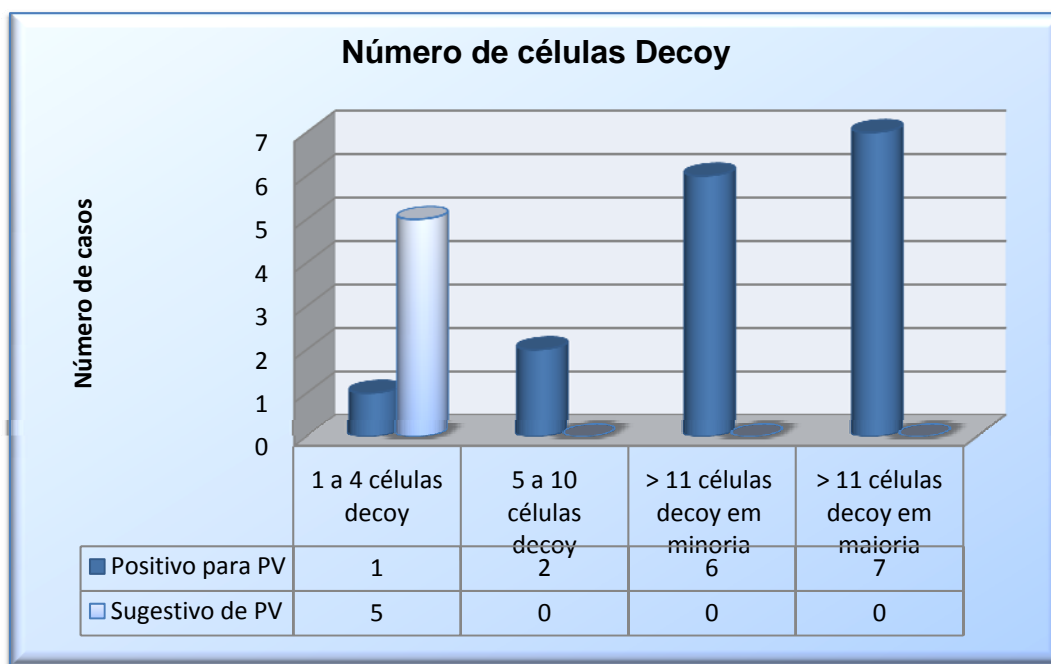


Fig. 17 – Correlação entre o número de células infectadas e o diagnóstico de positivo ou sugestivo para PV.

Foi realizada a técnica de CISH, nos 21 (60%) casos cuja citologia urinária foi positiva ou sugestiva para PV e nos 14 (40%) casos negativos que apresentavam células uroteliais, perfazendo um total de 35 casos.

Quando comparamos o diagnóstico citológico com o CISH (Figura 18) verificamos não ter havido positividade para o BKV, na totalidade dos casos (14) cujo diagnóstico citológico tinha sido negativo e, nos 5 casos que tinham sido sugestivos para PV. No que diz respeito às 16 citologias positivas para PV no diagnóstico citológico, 12 (75%) foram confirmadas pelo CISH como positivas para BKV e 4 (25%) foram negativas.

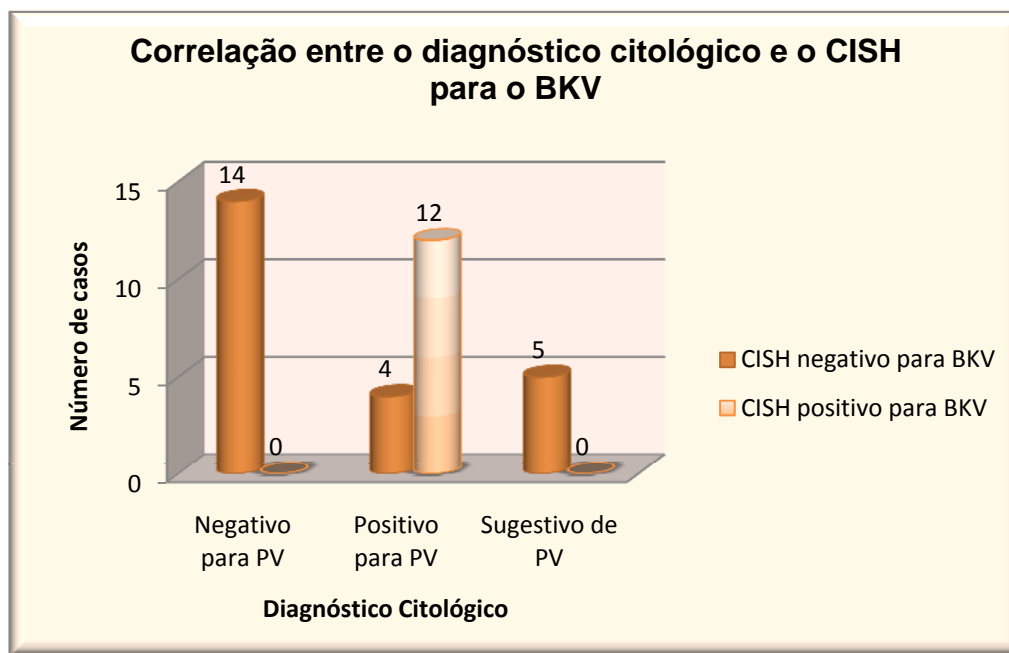


Fig. 18 – Correlação entre o diagnóstico citológico e o diagnóstico do CISH para o BKV.

Comparando o número de células *decoy* com o resultado do CISH (Figura 19) verificou-se que no grupo de 1 a 4 células, os 6 (28,6%) casos, 5 sugestivos e 1 positivo para PV, foram negativos para BKV, enquanto no grupo de 5 a 10 células, dos 2 (9,5%) casos, 1 (50%) foi negativo e 1 (50%) positivo para BKV. No grupo de mais de 11 células infectadas em minoria no sedimento, observou-se positividade para o BKV (Figura 20), em 5 (83,3%) dos 6 casos. Por último, no grupo de mais de 11 células infectadas em maioria no sedimento, das 7 citologias positivas para PV, 6 foram positivas para BKV e apenas 1 (14,3%) foi negativa no CISH.

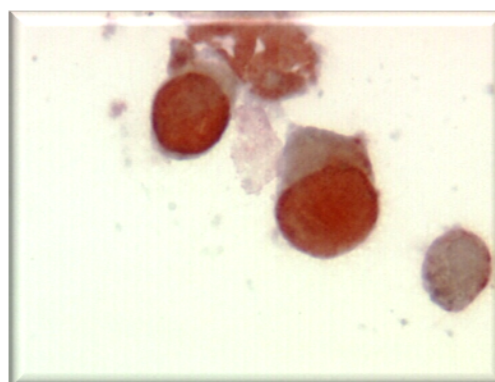


Fig. 20 – CISH em citologia urinária. Positividade para BKV, com confirmação por PCR (40x).

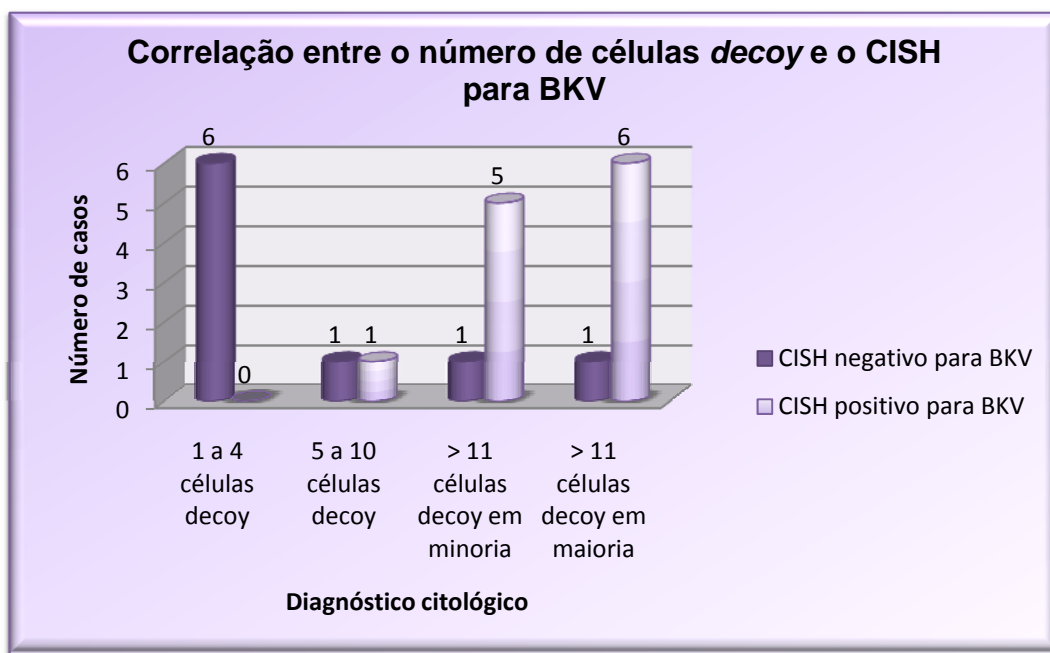


Fig. 19 – Correlação entre o número de células *decoy* na citologia urinária e o diagnóstico do CISH para o BKV.

Para confirmar os resultados obtidos na citologia urinária e no CISH, foi efectuado PCR para BKV e JCV em amostras de urina e de sangue, utilizando primers específicos. A detecção por PCR foi efectuada apenas em 40 (60,6%) dos 66 casos estudados. Dos 40 casos, 20 (50%) foram negativos na citologia urinária (6 com CISH e 14 sem CISH), 15 (37,5%) positivos e 5 (12,5%) sugestivos para PV (Tabela 2).

Dos 14 casos negativos para PV no diagnóstico citológico, e BKV no CISH, apenas 6 (23,1%) foram confirmados por PCR, tendo-se confirmado o resultado negativo no sangue e na urina para todos eles. Dos restantes 14 casos negativos na citologia urinária, sem CISH, 6 (15%) foram negativos para o BKV e para o JCV, 3 (7,5%) positivos na urina para o BKV e os outros 5 (12,5%) positivos na urina para o JCV.

Já em relação às citologias urinárias positivas e sugestivas para PV, foi feito PCR para 20 (76,9%) dos 21 casos. Dos 6 casos com 1 a 4 células *decoy*, 5 sugestivos e 1 positivo, a PCR confirmou a negatividade detectada com o CISH para o BKV em 4 (20%) casos; em relação aos outros dois casos, 1 (5%) foi

positivo para BKV na urina e 1 (5%) positivo para BKV na urina e no sangue. Em 3 dos 4 casos negativos para BKV no CISH verificou-se, no entanto, positividade para JCV, 2 (10%) na urina e 1 (5%) na urina e no sangue. No grupo de 5 a 10 células, dos 2 (9,5%) casos, apenas foi realizada PCR no caso que foi positivo no CISH, tendo-se confirmado a positividade para o BKV tanto na urina como no sangue. Em relação às citologias com mais de 11 células infectadas em minoria no sedimento, dos 5 casos positivos no CISH, foram também positivos na PCR para BKV, 1 (5%) na urina e os outros 4 (20%) na urina e no sangue; o caso positivo na citologia urinária e negativo no CISH, revelou positividade na urina para o JCV. Por último, no grupo de mais de 11 células infectadas em maioria no sedimento, o caso positivo na citologia urinária mas negativo no CISH, apresentava positividade na urina para o JCV. Dos restantes 6 casos positivos para o CISH, 5 (25%) foram positivos para o BKV na urina e no sangue e, 1 (5%) foi negativo para o BKV e positivo na urina para o JCV (Figura 21).

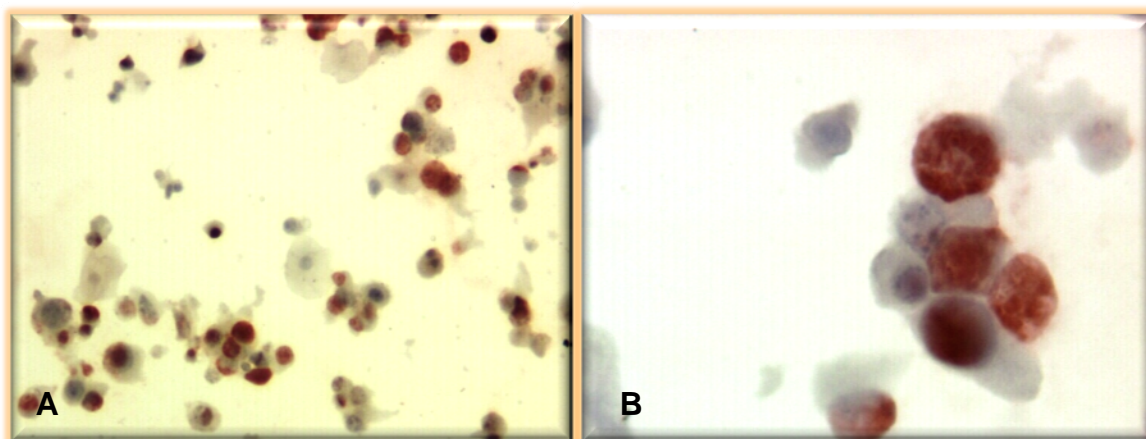


Fig. 21 – A) CISH em citologia urinária com positividade para BKV (10x); B) Citologia urinária positiva para BKV no CISH, cujo resultado da biologia molecular foi negativo para BKV e positiva para JCV na urina (40x).

Tabela 2 – Correlação entre o diagnóstico citológico, o CISH e a PCR para o BKV e o JCV no sangue e na urina.

		PCR - Urina e/ou sangue			
		BKV+	BKV- / JCV-	JCV+	Sem resultado
Diagnóstico citológico negativo	CISH +				
	CISH -		6		8
	Sem resultado	3	6	5	
1-4 células <i>decoy</i>	CISH +				
	CISH -	2	1	3	
5-10 células <i>decoy</i>	CISH +	1			
	CISH -				1
>11 células <i>decoy</i> em minoria	CISH +	5			
	CISH -			1	
>11 células <i>decoy</i> em maioria	CISH +	5		1	
	CISH -			1	

Quando analisadas estatisticamente as variáveis clinico-patológicas, em relação ao diagnóstico do BKV, observámos que a incidência de BKV na urina se associa significativamente com o sexo masculino ($p=0,035$), no período pós-transplante > 6 meses e no grupo etário 51-60 anos. Verificou-se ainda uma associação significativa do CISH com o diagnóstico citológico ($p=0,040$), o número de células *decoy* ($p=0,002$) e com o resultado da PCR para o BKV na urina e no sangue ($p=0,000$).

5. DISCUSSÃO

Dos muitos processos infecciosos que afectam os pacientes transplantados renais, a infecção por PV requer atenção especial. As razões para este interesse devem-se ao facto deste vírus apresentar tendência selectiva para infectar o rim transplantado, levando à disfunção e perda do enxerto.

A citologia urinária é um método de fácil execução e baixo custo, tendo um papel importante no diagnóstico da infecção activa por poliomavírus, sendo usada como método de *screening* para detectar o PV. Embora esteja documentado a existência de excreção de PV na urina de pacientes transplantados renais com uma função do enxerto estável, Drachenberg *et al* [26,44], demonstraram que a presença de mais de 10 células infectadas por PV na citologia urinária, está fortemente correlacionada com a presença de PV na biopsia histológica, não sendo, no entanto, indicação definitiva de nefropatia por BKV. A citologia urinária tem, no entanto, limitações no que diz respeito ao diagnóstico diferencial entre o BKV e o JCV. O diagnóstico diferencial é, no entanto importante, pois o JCV só muito raramente leva ao desenvolvimento de uma nefropatia [4,44]. Os resultados deste estudo mostraram que o CISH é um bom método de diagnóstico diferencial, permitindo distinguir infecções provocadas pelos dois tipos de PV.

De acordo com um estudo de Drachenberg *et al* [44], parece que uma carga viral baixa de BKV pode ser clinicamente significativa, sugerindo risco para o desenvolvimento de NBKV. Segundo o “algoritmo de rastreio de pacientes e protocolos de monitorização” proposto por Nickeleit *et al* em 2006 [37], um paciente com citologia urinária com mais de 10 células *decoy* deve ser submetido a biopsia renal, sem que seja necessário o diagnóstico da PCR no plasma e/ou urina para detectar o BKV. Se o rim não estiver afectado, o paciente é sujeito a um controlo mais apertado; se se observar uma NBKV, com ou sem rejeição, inicia-se o tratamento e monitorização da função renal. Nesta fase é importante a monitorização com PCR em tempo real, para avaliar a diminuição ou não da carga viral após o início do tratamento.

A conjugação da quantificação das células *decoy* (> 10 células *decoy*) na citologia urinária com o diagnóstico diferencial entre infecção por BKV ou JCV,

fornecido pelo CISH, segundo os resultados deste estudo, poderão ser usados como orientação clínica, para uma adequada avaliação do risco de desenvolver NBKV (Figura 22).

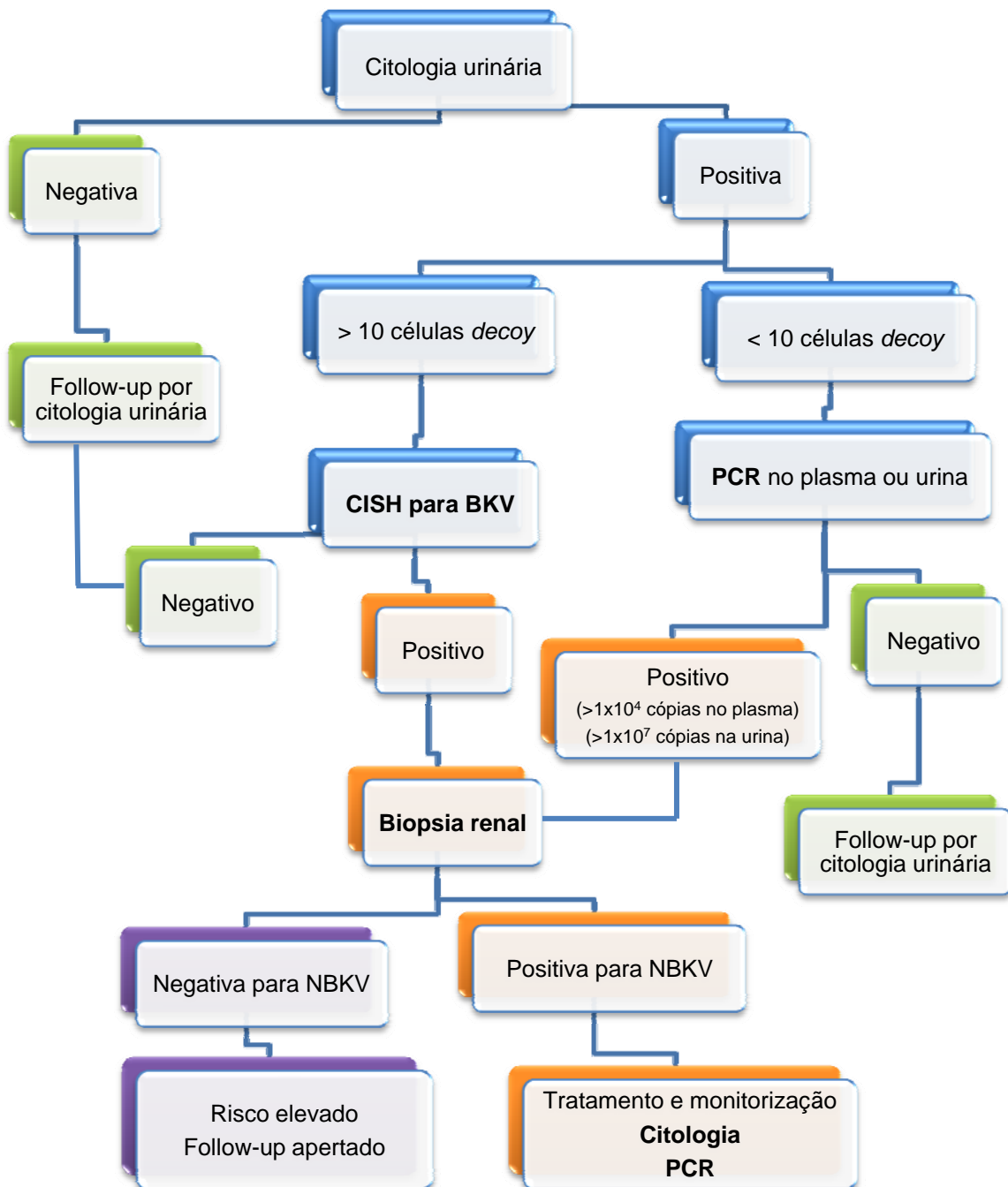


Fig. 22 – Esquema para orientação clínica e adequada avaliação do risco de desenvolver NBKV, em pacientes transplantados renais (adaptado da referência [37]).

No nosso estudo, a incidência de células *decoy* (31,8%) em urinas de pacientes transplantados renais, enquadra-se dentro dos 10 a 60% referidos na literatura, tendo a citologia mostrado uma sensibilidade de 65,5%, especificidade de 91,6% e um valor preditivo positivo de 90%. Existe alguma discrepância entre os valores da sensibilidade e especificidade obtidos neste estudo e os referidos na maioria das referências bibliográficas, 100% e 70 % respectivamente [5,21,46], no entanto, a especificidade aproxima-se da referida por Singh *et al* (95%) [24]. Em relação ao valor preditivo positivo, embora a maior parte dos autores refira encontrar-se entre os 25-30% [2,5,21,24,37,43,46], o obtido neste estudo é sobreponível ao observado por Dranchenberg *et al* em 2001 [44] e descrito por Singh *et al* [24]. A baixa sensibilidade obtida neste estudo pode estar, de alguma forma, relacionada com a escassa celularidade presente em parte das amostras e com o facto de 6 dos 10 falsos negativos serem constituídos apenas por células pavimentosas. Já em relação ao valor preditivo positivo, a discrepância observada pode estar relacionada com o método utilizado na preparação da citologia urinária, que permite a obtenção de esfregaços mais celulares do que outros métodos e com a boa preservação da citologia urinária, impedindo desta forma a presença de artefactos que possam induzir em erro.

Em relação à incidência por sexo, os dados deste estudo são concordantes com os da literatura [42], observando-se uma maior incidência no sexo masculino (35,3%) em comparação com o feminino (20%). Quando observamos a idade dos pacientes, verificamos haver uma associação significativa ($p<0,05$) entre o aumento da idade e a incidência de células *decoy* na citologia urinária, sendo o grupo etário 51-60 anos o que apresenta maior número de casos. Os grupos com menos de 31 e acima de 60 anos, apresentaram um menor número de casos, 1 caso sugestivo, o que vai de encontro à bibliografia [42]. Esta relação pode estar associada ao facto de, pacientes com idade mais avançada poderem ser mais imunocomprometidos do que os pacientes mais jovens, com a mesma dosagem de medicação imunossupressora, aumentando desta forma o risco de infecção por PV [42].

De acordo com alguns estudos [6,8,36,45], a maioria dos episódios de infecção por PV e consequentemente nefrite intersticial por BKV ocorre nos

primeiros três meses após o transplante. Neste estudo observou-se que ocorreu um maior número de citologias positivas ou sugestivas para PV após 6 meses do transplante, 11 dos 21 casos. Avaliando retrospectivamente o historial clínico destes pacientes, verifica-se que dos 17 casos positivos e sugestivos para PV, com mais de 3 meses de transplante, apenas 6 fizeram citologias urinárias antes deste estudo. Das 6, 4 foram efectuadas no período <3 meses e 3 delas foram positivas para PV. Perante esta observação retrospectiva, pode-se pensar que a discrepância com outros estudos, pode estar relacionada com o facto de terem sido incluídos neste estudo poucos pacientes (9) cujos transplantes tenham sido efectuados no período < 3 meses (não existe uma política de *follow-up* através da citologia urinária) e da amostragem estar associada a um período de tempo muito curto.

Drachenberg *et al* [26], num estudo realizado em 1999, quantificou as células *decoy* na urina como raras, acima de quatro e mais de 10 células. Na avaliação da lâmina teve também em atenção o fundo, se era ou não inflamatório. Em 2001, num outro estudo [44], as urinas foram classificadas semiquantitativamente de acordo com o número de células *decoy* em 1-4 células infectadas, 5-10 células infectadas, >11 infectadas em minoria no sedimento e >11 células infectadas em maioria no sedimento. Estes estudos mostraram que os doentes com raras células *decoy* e fundo não inflamatório têm menos probabilidade de ter uma biopsia com infecção com BKV do que os doentes com muitas células *decoy* e fundo inflamatório. Os doentes com muitas células *decoy* (mais de 11) na urina, sedimento inflamatório e biopsia com nefrite intersticial apresentam um aumento mais significativo na redução da função renal que os doentes sem evidência de infecção por PV na urina e na biopsia.

No presente trabalho foram quantificadas as células *decoy* com base no estudo de Drachenberg efectuado em 2001 [44], não tendo sido efectuada a avaliação da lâmina em relação ao fundo inflamatório, uma vez que o método de *ThinPrep*® elimina uma grande percentagem das células inflamatórias. Dos 21 casos positivos e sugestivos, 13 tinham mais de 11 células *decoy* na citologia urinária (7 em maioria no sedimento e 6 em minoria), havendo correlação com a histologia em 9 dos casos. O diagnóstico histológico mostrou haver nefrite túbulo-

intersticial associada a infecção por poliomavírus em 6 dos 9 casos. Dos 8 casos com menos de 10 células *decoy* apenas 1 caso sugestivo de infecção por PV com menos de 4 células apresentou biopsia histológica, tendo-se confirmado o diagnóstico de nefrite túbulo-intersticial associada a infecção por poliomavírus. Este caso apresentava escassa celularidade, podendo ser essa a causa para a discrepância com a bibliografia. Da análise estatística dos resultados, pode-se concluir que existe uma correlação entre o diagnóstico citológico e o diagnóstico histológico ($p=0,025$), assim como entre o número de células infectadas por PV na urina e a biopsia histológica ($p=0,015$), o que vai de encontro aos resultados obtidos por Dranchenberg [44] em 2001. Não se verificaram diferenças entre o grupo com >11 células em minoria ou em maioria no sedimento urinário, tornando este pormenor irrelevante. Pode então concluir-se que, em termos de diagnóstico citológico, a semiquantificação em quatro grupos não é relevante, sendo mais importante a quantificação em > 10 células *decoy*, o que está de acordo com o descrito por Nিকেleit *et al* [37] em 2006.

Em relação à comparação entre os resultados de CISH e a citologia urinária, a falta de estudos na literatura não permite fazer a comparação dos resultados. Os nossos resultados indicam que o CISH é importante no diagnóstico diferencial de BKV e JCV. Nos casos cuja citologia é negativa para células *decoy*, não foi possível com este estudo, concluir se o CISH terá ou não um contributo importante no diagnóstico dos falsos-negativos na citologia urinária. Isto deve-se ao facto de não ter sido feito CISH em todos os casos negativos, à falta de representatividade de células uroteliais, e também porque dos 14 casos negativos na citologia urinária e negativos no CISH, apenas para 6 foi feita a detecção por PCR, tendo o resultado sido negativo em todos os casos. Nos 5 casos sugestivos de infecção por PV na citologia urinária e negativos no CISH, verificou-se que em 1 caso não havia qualquer infecção por PV, enquanto nos outros 4 casos, 2 foram positivos para o BKV e 2 para o JCV na detecção por PCR. Nestes casos o CISH não foi uma mais-valia, pois não foi possível por este método confirmar as suspeitas da citologia e fazer o diagnóstico diferencial entre o BKV e o JCV. Em relação ao caso sugestivo na citologia urinária mas negativo no PCR, possivelmente houve um erro de interpretação, talvez devido à má preservação

celular; não podemos, no entanto, considerar um falso-positivo, uma vez que, segundo a citologia, foi diagnosticado como sugestivo de infecção por PV. No que diz respeito aos 2 falsos-negativos do CISH, podem estar associados à baixa celularidade nas amostras. Nos 16 casos positivos para PV na citologia urinária, o CISH mostrou ser importante no diagnóstico diferencial entre o BKV e o JCV, tendo confirmado BKV em 12 dos 16 casos. Dos 4 casos negativos para CISH, um não foi avaliado por PCR e os outros 3 foram negativos para o BKV. Dois destes apresentavam mais de 10 células *decoy*, na citologia urinária, pelo que estes pacientes teriam um risco aumentado de desenvolver nefrite associada ao BKV. A realização da técnica de CISH, permitiu nestes casos, fazer um diagnóstico diferencial entre o BKV e o JCV, tendo-se concluído que estes dois pacientes não tinham infecção por BKV. A detecção por PCR, confirmou o diagnóstico de negativo para BKV e positivo para JCV.

Parece-nos relevante referenciar um dos casos positivos na citologia urinária, pertencente ao grupo >11 células *decoy* em maioria no sedimento, que apresentou positividade para o BKV no CISH, não tendo, no entanto, sido confirmado por PCR para a presença de BKV. Esta amostra apresentava abundantes células *decoy*, mas com o CISH, verificou-se que apenas uma pequena percentagem das células *decoy* indicou a presença de BKV. A observação microscópica da lâmina permitiu verificar que uma grande parte das células que não se encontravam marcadas, eram células *decoy*, o que levanta a hipótese deste paciente ter reactivação do BKV e JCV em simultâneo. A detecção por PCR efectuada na mesma data que a citologia urinária, foi positiva apenas para o JCV na urina. Passados 5 meses, este paciente apresentava viremia e viruria negativas para JCV e viremia positiva para BKV com viruria negativa. A positividade do BKV no sangue com negatividade na urina é estranha, uma vez que a viruria precede a viremia. No entanto, os resultados da detecção por PCR foram confirmados.

A técnica de CISH tal como a detecção por PCR convencional, permite apenas classificar as amostras como positivas ou negativas para BKV, mas o CISH é um método de diagnóstico menos dispendioso que a PCR convencional, consegue dar uma resposta mais rápida e não requer pessoal treinado

especificamente. A sensibilidade da PCR é uma das grandes vantagens deste método, mas torna-se também na sua principal desvantagem por ser capaz de amplificar pequenas quantidades de DNA contaminante. Esta desvantagem é ultrapassada pelo CISH, uma vez que a detecção é efectuada in situ, localizando o BKV com precisão na célula, permitindo uma avaliação morfológica. Embora o CISH apresente vantagens no diagnóstico diferencial entre BKV e JCV, em amostras com células descamadas e observadas na citologia urinária, continua a ser necessário esclarecer qual a origem das células infectadas: urotélio da bexiga ou dos ureteres. Na tentativa de dar resposta a esta questão poder-se-ia efectuar uma dupla marcação IHQ, em todos os casos positivos para poliomavírus com mais de 10 células decoy, na citologia urinária. Efectuar-se-ia uma marcação nuclear com o anticorpo SV40 TAg e posteriormente uma marcação de membrana citoplasmática com um anticorpo específico para células dos túbulos renais. Desta forma, ficaria esclarecida a origem das células infectadas.

Neste trabalho a técnica de CISH não mostrou ser uma mais-valia na diminuição dos falsos negativos da citologia urinária, sendo no entanto, uma ferramenta importante no diagnóstico diferencial entre o BKV e o JCV, permitindo desta forma excluir os casos JCV positivos da citologia urinária, contribuindo para uma melhor identificação dos doentes com potencial risco para NBKV.

6. CONCLUSÃO

A NBKV é uma doença grave que afecta principalmente os transplantados renais. Os avanços recentes na avaliação do risco, o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico não invasivo e o estadiamento da doença tem permitido aumentar a sobrevivência do enxerto em vários pacientes.

Deste estudo pode-se concluir que a conjugação da quantificação das células *decoy* (>10 células *decoy*), na citologia urinária, com o diagnóstico diferencial entre infecção por BKV ou JCV, fornecido pelo CISH, dá uma informação mais precisa ao clínico, sendo apenas necessário confirmar se o rim está ou não afectado.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Gerales A. Papovavírus.In: Ferreira WC, Sousa JC. Microbiologia. Lisboa: Lidel, 2002. V.3. Cap. 5, p.63-66.
- [2] Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney International*, v.69(4), p.655-662, 2006.
- [3] Splendiani G, Cipriani S, Condó S, et al. Polyoma Virus BK and Renal Dysfunction in a Transplanted Population. *Transplantation Proceedings*, v.36, p.713-715, 2004.
- [4] Drachenberg CB, Hirsh HH, Ramos E, et al. Polyomavirus disease in renal transplantation: review of pathological findings and diagnostic methods. *Human Pathology*, v.36(12), p.1245-1255, 2005.
- [5] Dall A, Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Clinical Journal American Society of Nephrology*, v.3, p.S68-S75, 2008.
- [6] Pahari A, Rees L. BK virus – associated renal problems – clinical implications. *Pediatric Nephrology*, v.18, p.742-748, 2003.
- [7] Mischitelli M, Bellizzi A, Anzivino H, et al. Complications post renal transplantation: literature focus on BK vírus nephropathy and diagnostic tools actually available. *Virology Journal*, v.5, p.38-43, 2008.
- [8] Montagner JM, Michelon TF, Schroeder RB, et al. Poliomavírus – um patógeno emergente para receptores de transplantes. *Einstein*, v.5(2), p.184-189, 2007.

- [9] Behzad-Behbahani A, Klapper PE, Vallely PJ, et al. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridisation. *Journal of Clinical Virology*, v.29, p.224-229, 2004.
- [10] Takayama T, Miura K, Han G, et al. BK virus subtype 1 infection associated with tubulointerstitial nephritis in a renal allograft recipient. *International Journal of Urology*, v.11, p.656-662, 2004.
- [11] Gaynor AM, Nissen MD, Whitley DM et, al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *Plos Pathogens*, v.3, p.595-604, 2007.
- [12] Nicleleit V, Klimkait T, Binet IF, et al. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *The New England Journal of Medicine*, v.342(18), p.1309-1315, 2000.
- [13] Nicleleit V, Singh HK. Polyomavirus allograft nephropathy: Clinico-pathological correlations. *Madame Curie Bioscience Database*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=eurekah&part=A74503>, 2009
- [14] Fonseca A, Fonseca F. A importância da investigação laboratorial do vírus JC (Vírus Polyoma) e sua interpretação clínica. *NewsLab*, edição 78, p.140-148, 2006.
- [15] Allander T, Andreasson K, Gupta S, et al. Identification of third human Polyomavirus. *Journal of Virology*, v.81, N.º8, p.4130-4136, 2007.
- [16] Eash S, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ. The human polyomaviruses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.63, p.865-876, 2006.

- [17] Miyamura T, Jikuya H, Soeda E, Yoshiike K. Genomic structure of human polyoma virus JC: nucleotide sequence of the region containing replication origin and small-T-antigen gene. *JouRNAl of Virology*, v.45(1), p.73-79, 1983.
- [18] Cubitt CL. Molecular genetics of the BK virus. *Advances in experimental medicine and biology*, v.577, p.85-95, 2006.
- [19] Eash S, Querbes W, Atwood WJ. Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *JouRNAl of Virology*, v.78(21), p.11583-11590, 2004.
- [20] Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Wali R, et al. BK polyoma virus allograft nephropathy: ultrastructural features from viral cell entry to lysis. *American JouRNAl of Transplantation*, v.3(11), p.1383-1392, 2003.
- [21] Weiss M, et al. Pyelonephritis and other infections, reflux nephropathy, hydronephrosis, and nephrolithiasis. In: Charles JJ, et al. **Pathology of the Kidney**. 6^aed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Volume 2, Cap. 22, pg 1018-1021.
- [22] Almeida M, Martins LS, Dias L, et al. Infecção por Poliomavírus: tratamento com Cidofovir e Imunoglobulina Inespecífica, um esquema promissor. *Revista Portuguesa de Nefrologia e Hipertensão*, v.20 (1), p.51-60, 2006.
- [23] Herawi M, Parwani AV, Chan T, et al. Polyoma virus-associated cellular changes in the urine and bladder biopsy samples: a cytohistologic correlation. *American JouRNAl of Surgical Pathology*, v.30(3), p.345-350, 2006.
- [24] Singh HK, Bubendorf L, Mihatsch MJ, et al. Urine cytology findings of polyomavirus infections. *Advances in experimental medicine and biology*, v.577, p.201-212, 2006.

- [25] Drachenberg CB, Munivenkatappa RB, Papadimitriou JC. Update on pathological features of polyomavirus allograft nephropathy. *Current Opinion in Organ Transplantation*, v.11, p.277-282, 2006.
- [26] Drachenberg CB, Beskow CO, Cangro CB, et al. Human Polyoma virus in renal allograft biopsies: morphological findings and correlation with urine cytology. *Human Pathology*, v.30(8), p.970-977, 1999.
- [27] Weiskittel P. Polyoma Virus in Renal transplant Recipients. *Nephrology Nursing JouRNAl*, v.29, No.3, p.247-250, 2002.
- [28] Randhawa P, Brennan DC. BK Virus Infection in Transplant Recipients: An Overview and Update. *American JouRNAl of Transplantation*, v.6, p.2000-2005, 2006.
- [29] Bohl DL, Storch G, Ryschkewitsch C, et al. Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *American JouRNAl of Transplantation*, v.5(9), p.2213-2221, 2005.
- [30] Vasudev B, Hariharan S, Hussain SA, et al. BK virus nephritis: risk factors, timing, and outcome in renal transplants recipients. *Kidney InteRNAtional*, v.68, p.1834-1839, 2005.
- [31] Hirsh HH, Drachenberg CB, Steiger J, Ramos, E. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: critical issues of screening and management. *Advances in experimental medicine and biology*, v.577, p.160-173, 2006.
- [32] Brennan DC, Agha I, Bohl DL, et al. BK Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *American JouRNAl of Transplant*, v.5(3), p.582-594, 2005

- [33] Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation*, v.79(10), p.1277-1286, 2005.
- [34] Bohl DL, Brennan DC. BK Virus Nephropathy and Kidney Transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v.2, p.S36-S46, 2007.
- [35] Meehan SM, Kraus MD, Kadambi PV, Chang A. Nephron segment localization of polyoma virus large T antigen in renal allografts. *Human Pathology*, v.37(11), p.1400-1406, 2006.
- [36] Merlino C, Bergallo M, Gribaudo G, et al. Polyomavirus BK *DNA* quantification assay to evaluate viral load in renal transplant recipients. *Journal of Clinical Virology*, v.28, p.265-274, 2003.
- [37] Nicleleit V, Mihatsch M. Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allografts: an update on an escalating threat. *Journal of Clinical Microbiology*, v.19, p.960-973, 2006.
- [38] Colvin RB, Nicleleit V. Renal Transplant Pathology. In: Charles JJ et al. **Pathology of the Kidney**. 6thed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Volume 2, Cap. 28, pg 1441-1447.
- [39] Randhawa P, Ho A, Shapiro R, et al. Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) *DNA* with clinical courses of BKV infection in renal transplant patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42(3), p.1176-1180, 2004.
- [40] Ramos E, Drachenberg CB, Portocarrero M, et al. BK virus nephropathy diagnosis and treatment: experience at the University of Maryland Renal Transplant Program. *Clinical Transplant*, p.143-153, 2002.

- [41] Ginevri F, Azzi A, Botti G, Comoli P. Polyomavirus BK-associated nephropathy after kidney transplantation. *GioRNAle Italiano di Nefrologia*, v.23(6), p.575-584, 2006.
- [42] Geramizadeh B, Roozbeh J, Malek-Hosseini SA, et al. Urine Cytology as a Useful Screening method for Polyoma Virus Nephropathy in Renal Transplant Patients: A Single-Center Experience. *Transplantation Proceedings*, v.38, p.2923-2925, 2006.
- [43] Santos RLS, Manfrinatto JA, Cia EMM, et al. Urine Cytology as a Screening Method for Polyoma Virus Active Infection. *Transplantation Proceedings*, v.36, p.899-901, 2004.
- [44] Drachenberg RC, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, et al. Morphological spectrum of polyoma virus disease in renal allografts: diagnostic accuracy of urine cytology. *American Journal of Transplantation*, v.1(4), p.373-381, 2001.
- [45] Gardner SD, Mackenzie EF, Smith C, Porter AA. BK Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. *Journal of Clinical Pathology*, v.37(5), p.578-586, 1984.
- [46] Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *The New England Journal of Medicine*, v.347, n.º 7, p.488-496, 2002.
- [47] Bressollette BC, Coste BM, Hourmant M, et al. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *American Journal of Transplant*, v.5(8), p.1926-1933, 2005.
- [48] Willebrand EV, Savikko J, Merenmies J, Jalanko H. Human Polyoma Virus in Kidney Transplants: SV40 T-Antigen Demonstration in the Urine. *Transplantation Proceedings*, v.37, p.945-946, 2005.

[49] Silva MG, Almeida FCS, Matizonkas LF et al. Hibridização *in situ* com sonda não-radioativa para *mRNA*: princípios e aplicações em patologia. *JoRNAI Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial*, v. 42, n.º 3, p.207-213, 2006.

ANEXO A

Tabela dos resultados globais obtidos neste estudo

Exame	sexo	datanasc	datatransp	Diag_citol	CISH	BKV_urina	BKV_sangue	JCV_urina	JCV_sangue
04119	M	1957	18-01-2007	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
04802	M	1957	18-01-2007	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
04850	F	1974	10-03-2009	Negativo		Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
04852	M	1960	11-02-2009	Negativo		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
04969	M	1938	20-11-2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
05053	M	1960	09-03-2009	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
05191	M	1096	24-02-2009	Negativo	Negativo		Negativo		
05220	M	1954	17-01-2005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
05221	M	1981	20-01-2009	Negativo		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
05222	M	1965	04-11-2008	Negativo		Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
05284	F	1973	28-06-2001	Negativo		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
05330	M	1950	07-08-2008	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
05416	M	1961	17-11-2008	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
05521	M	1957	18-01-2007	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
05589	M	1962	10-07-2008	Negativo					
05617	M	1961	26-08-2005	Negativo					
05680	M	1935	01-04-1994	Negativo	Negativo				
05799	M	1959	20-02-2009	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
05800	F	1971	27-04-2005	Negativo		Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
05817	F	1969	24-02-2009	Sugestivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
05818	M	1978	25-07-2008	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
05819	M	1981	20-01-2009	Sugestivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
06063	M	1958	10-08-2001	Negativo	Negativo				
06076	F	1954	05-01-2008	Negativo	Negativo				

06077	M	1971	13-06-2006	Negativo	Negativo				
06149	M	1960	24-02-2009	Negativo					
06343	M	1976	30-01-2007	Negativo		Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
06344	M	1954	01-04-2005	Negativo		Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
06459	F	1971	28-02-2008	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
06466	M	1962	01-03-2009	Negativo					
06499	M	1971	02-06-2009	Negativo	Negativo	Negativo		Positivo	
06539	M	1947	02-12-2001	Negativo					
06593	F	1973	02-06-2004	Negativo					
06594	F	1970	15-07-2005	Negativo	Negativo				
06703	F	1981	06-10-2008	Negativo		Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
06705	M	1957	18-01-2007	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
06755	M	1967	02-06-2001	Negativo					
06799	M	1955	01-08-2001	Negativo					
06866	M	1970	12-06-2003	Negativo		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
06873	M	1952	09-05-2004	Positivo	Negativo				
06902	M	1973	03-06-2001	Negativo		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
06991	M	1953	04-06-1989	Negativo					
07056	F	1982	03-10-2008	Negativo					
07131	M	1977	16-03-2004	Negativo					
07138	M	1952	04-11-2002	Negativo					
07160	M	1984	04-12-2001	Negativo		Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
07199	F	1964	13-12-2007	Sugestivo	Negativo	Positivo		Negativo	
07224	M	1972	10-05-2008	Positivo	Positivo		Positivo		Negativo
07257	M	1967	27-05-2008	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo

07258	M	1960	09-05-2005	Negativo	Negativo				
07316	M	1975	09-05-2009	Sugestivo	Negativo	Negativo		Positivo	
07317	F	1981	24-11-2001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
07324	F	1967	02-07-2001	Negativo		Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
07348	M	1959	20-02-2009	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
07351	M	1979	25-02-2009	Negativo					
07513	M	1981	20-01-2009	Negativo		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
07516	M	1953	07-01-2008	Sugestivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
07557	M	1959	20-02-2009	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
07558	F	1986	10-07-2007	Negativo					
07736	M	1973	11-09-2008	Negativo					
07737	F	1970	14-09-2002	Negativo	Negativo				
07789	M	1981	28-05-2005	Negativo					
07918	M	1951	15-12-2007	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
07919	M	1979	25-02-2009	Negativo	Negativo				
08074	M	1957	18-01-2007	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
08075	M	1962	01-03-2009	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo